

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1967

THÈSE

517
n°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Jean-Claude MARCHAND

né le 23 Août 1938 à Saint-Aubin-sur-Scie (76)

Licencié es-Sciences

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Attaché-Assistant de Biochimie à la Faculté de Médecine

Attaché-Assistant de Biochimie à l'Hôpital des Enfants Malades

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

"ENZYMES GLYCOLYTIQUES TISSULAIRES"

Président : M. CARTIER, Professeur.

ÉDITIONS A.G.E.M.P. 40 RUE PASCAL PARIS

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNEE 1967

THÈSE

n°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLÔME D'ÉTAT)

PAR

Jean-Claude MARCHAND

né le 23 Août 1938 à Saint-Aubin-sur-Scie (76)

Licencié es-Sciences

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Attaché-Assistant de Biochimie à la Faculté de Médecine

Attaché-Assistant de Biochimie à l'Hôpital des Enfants Malades

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

"ENZYMES GLYCOLYTIQUES TISSULAIRES"

Président : M. CARTIER, Professeur.

ÉDITIONS A.G.E.M.P. 40 RUE PASCAL PARIS

Digitized by the Internet Archive
in 2026



https://archive.org/details/IA41549003_0011

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Alajouanine (T.), Bénard (H.), Bernard (E.), Binet (L.), Bulliard (H.), Cathala (J.), Chabrol (E.), Chailley-Bert (P.), Cheymol (J.), Debré (R.), Fey (B.), Galliard (H.), Gaudart d'Allaines (F. de), Gennes (L. de), Giroud (A.), Hazard (R.), Heuyer (G.), Laroche (G.), Lavier (G.), Lelong (M.), Lévy (M^{lle} J.), Lévy-Solal (E.), Lian (C.), Marchal (G.), Mathieu (P.), Monod (R.), Moreau (R.), Moulonguet (P.), Pasteur Vallery-Radot, Petit-Dutaillis (D.), Piédelièvre (R.), Quénu (J.), Renard (G.), Senèque (J.), Strohl (A.), Tanon (L.), Verne (J.).

DOYEN Georges BROUET.

1^{er} ASSESSEUR Daniel BARGETON

2^e ASSESSEUR Jean GOSSET

I. — PROFESSEURS

1^o CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

MM.

Anatomie	DELMAS (A.)
—	HUARD (P.)
Anatomie et cytologie pathologiques	DELARUE (J.)
Anesthésiologie	VOURC'H (G.)
Bactériologie et virologie	TOURNIER (P.)
Biochimie médicale	JAYLE (M.-F.)
—	POLONOVSKI (J.)
—	DESGREZ (P.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	MALMEJAC (J.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Biophysique médicale	BUGNARD (L.)
—	DOGNON (A.)
—	DJOURNO (A.)
Cancérologie expérimentale	MATHÉ (G.)
Chimie pathologique	SCHAPIRA (G.)
Génétique fondamentale	LEJEUNE (J.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	COURY (Ch.)
Histologie et Embryologie	TUCHMANN-DUPLESSIS (H.)
—	COUJARD (R.)
Hygiène et médecine préventive	BOYER (J.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale, Droit médical et déontologie	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R.)
Parasitologie	N...
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G.)
—	KUSS (R.)
—	VERNE (J.-M.)
Pathologie exotique	BRUMPT (L.-G.)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	LAROCHE (Cl.)
—	BRICAIRE (H.)
—	PÉQUIGNOT (H.)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales	MAURICE (P.)
Pharmacologie	BOISSIER (J.-R.)
—	LECHAT (P.)
Physiologie	BARGETON (D.)
—	PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales	LEPAGE (F.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)

	MM.
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	N...
Thérapeutique	LAMOTTE (M.)
Thérapeutique appliquée	N...

b) Professeurs à titre personnel :

Anatomie	CABROL (Ch.)
Anatomie anthropologique	OLIVIER (G.)
Anatomie pathologique	NEZELOF (Ch.)
Bactériologie	BARBIER (P.)
Biochimie médicale	DREYFUS (J.-Cl.)
Biologie médicale	BOURLIÈRE (F.)
Parasitologie	LARIVIÈRE (M.)
Pathologie expérimentale	LOEPER (J.)
Physiologie	{ DEJOURS (P.)
	{ SCHERRER (J.)
	{ KELLERSHOHN (L.)
	{ GOUGEROT (L.)
Physique médicale	{ ROUCAYROL (J.-Cl.)
	{ TUBIANA (M.)
	{ FISCHGOLD (H.)
Radiologie médicale	

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Clinique carcinologique	DENOIX P.
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)	SOULIÉ (P.)
— — — (Boucicaut)	LENÈGRE (J.)
Cliniques chirurgicales	Beaujon LORTAT-JACOB (J.-L.)
	— — — — — BAUMANN (J.)
	Cochin LEGER (L.)
	Hôtel-Dieu PATEL (J.)
	Saint-Antoine GOSSET (J.)
	Salpêtrière SICARD (A.)
	Tenon OLIVIER (Cl.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin)	MERLE d'AUBIGNÉ (R.)
— — — — — (Foch)	PADOVANI (P.)
— — — — — (Beaujon)	CAUCHOIX (J.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)	FÈVRE (M.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie thoracique (Laennec)	MATHEY (J.)
Clinique dermatologique (Saint-Louis)	DUPERRAT (F.)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades)	LAMY (M.)
Clinique chirurgicale et gynécologique (Broca)	HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades)	TURPIN (R.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	BERNARD (J.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)	CASTAIGNE (P.)
	Bicêtre DEPARIS (M.)
	Broussais MILLIEZ (P.)
	Cochin N...
Cliniques médicales	Hôtel-Dieu BARIÉTY (M.)
	Pitié DREYFUS (G.)
	Saint-Antoine CONTE (M.)
	Saint-Antoine KOURILSKY (R.)
	Saint-Antoine BOUDIN (G.)

Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat)	DEBRAY (Ch.)
Clinique médicale infantile et pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais)	JUSTIN-BESANÇON (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies métaboliques (Hôtel-Dieu)	DEROT (M.)
Clinique néphrologique (Necker)	HAMBURGER (J.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales	Baudelocque Saint-Antoine
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal)	MERGER (R.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu)	VARANGOT (J.)
— — (Cochin)	OFFRET (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	BREGEAT (P.)
Clinique de pédiatrie (Trousseau)	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent-de-Paul)	MOZZICONACCI (P.)
Clinique de pneumo-ptisiologie (Laennec)	THIEFFRY (S.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière)	BROUET (G.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie (Lariboisière)	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Salpêtrière)	SÈZE (S. de)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	ROUX (M.)
Clinique toxicologique (F. Vidal)	LEMAIRE (A.)
Clinique traumatologique et orthopédique (R.-Poincaré)	GAULTIER (M.)
Clinique urologique (Cochin)	JUDET (R.)
— — (Necker)	ABOULKER (P.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	COUVELAIRE (R.)
Séméiologie médicale (A. Chantin)	LAPLANE (R.)
— — (Lariboisière)	DOMART (A.)
— — (Pitié)	BOUVRAIN (Y.)
— — (Rothschild)	RAMBERT (P.)
Séméiologie et clinique chirurgicales (Broussais)	WOLFROMM (R.)
	POILLEUX (F.)

b) Professeurs à titre personnel :

Hématologie	ANDRÉ (R.)
	BOUSSER (J.)
Hydrologie et climatologie	GIBERTON (A.)
Maladies infectieuses	BASTIN (R.)
	AZERAD (E.)
	BOUR (H.)
	CAROLI (J.)
	DREYFUS (B.)
	GROSSIORD (A.)
Médecine	LAMBLING (A.)
	LAUNAY (Cl.)
	PAYET (M.)
	PERRAULT (M.)
	SIGUIER (F.)
	WORMS (R.)
Néphrologie	RICHET (G.)
Neuro-chirurgie	LE BEAU (J.)
Neurologie	LHERMITTE F.
Neuro-psychiatrie	PICHOT (P.)
Oto-Rhino-Laryngologie	MADURO (R.)
	POLONOVSKI (Cl.)
Pédiatrie	ROYER (P.)
	KREIS (B.)
Pneumo-Phtisiologie	MEYER (A.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE

	MM		MM.
Anatomie pathologique . . .	GOUYER (Ch.)	Maladies infectieuses . . .	DUPONT (V.)
Bactériologie	CHRISTOL (D.)	Neuro-psychiatrie	TARDIEU (G.)
Biochimie médicale	{ CARTIER (P.) GONNARD (P.) NORDMANN (J.)	Pédiatrie	ROSSIER (A.)
Biologie médicale	HARTMANN (L.)	Physique médicale	{ COURSAGET (J.) GREMY (F.)
Chirurgie	CERBONNET (G.)	Physiologie	GIRARD (Fr.)
Hématologie	BILSKI-PASQUIER (G.)	Stomatologie	CHAPUT (M ^{me} A.)

III. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie	HAUDUROY (P.) Pr. s. ch.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

IV. — PROFESSEURS ASSOCIÉS

Hormonologie	MORICARD (R.)
Statistique médicale et épidémiologique . .	SCHWARTZ (D.)

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Conseiller administratif	Mlle CHAINTREUIL (G.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque . .	{ M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine	
Conservateurs	{ Mlles DUMAITRE (P.), LAURENT (H.), LE NOIR (G.)
Bibliothécaires	{ Mmes CONTET (J.), FORGET (F.), Mlles DUROZOY (M.-F.), ROBERGE (D.), Dr SCHILLER (J.)

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A ma mère.

A ma femme.

A Monsieur le Professeur CARTIER.

qui a choisi le sujet de cette thèse
et a bien voulu en accepter la
Présidence.

Qu'il veuille bien trouver ici
l'expression de ma profonde
gratitude.

A mes Maitres dans les Hopitaux.

A Monsieur le Docteur LEMERCIER.

A Monsieur le Docteur MANIGUET.

P L A N

- Chapitre 1 : Cinétique enzymatique.
- Chapitre 2 : La glycolyse.
- Chapitre 3 : Extraction et stabilité des enzymes.
- Chapitre 4 : Principes des dosages enzymatiques.
- Chapitre 5 : Les techniques de dosage.
- Chapitre 6 : Résultats.
- Chapitre 7 : Pathologie.
-

ABREVIATIONS

ATP	: acide adénosine triphosphorique
ADP	: acide adénosine diphosphorique
AMP	: acide adénosine monophosphorique
DPN	: diphosphopyridine nucléotide
DPNH	: diphosphopyridine nucléotide réduit
TPN	: triphosphopyridine nucléotide
TPNH	: triphosphopyridine nucléotide réduit
F I P	: fructose I phosphate
F 6 P	: fructose 6 phosphate
F I-6 DP	: Fructose I-6 diphosphate
G I P	: glucose I phosphate
G 6 P	: glucose 6 phosphate
G I-6 DP	: Glucose I-6 diphosphate
R 5 P	: ribose 5 phosphate
3 P G	: 3phosphoglycérate
I-3 DPG	: I-3 diphosphoglycérate
2-3 DPG	: 2-3 diphosphoglycérate
Eno	: enolase
GK	: glucokinase
HK	: hexokinase
LDH	: lactico-deshydrogénase
PFK	: phosphofructokinase
PGK	: phospho-glycérate kinase
PGM	: phospho-glycérate mutase
PHI	: phospho-hexo-isomérase

PK : pyruvate kinase

TPI : triose phosphate isomérase

GAPD: 3 phospho-glycéraldéhyde déshydrogénase

I N T R O D U C T I O N

La glycolyse tissulaire a déjà fait l'objet de nombreuses publications, non seulement dans la littérature biochimique, mais aussi dans les revues médicales ; l'intérêt qu'elle suscite prouve amplement son importance, tant par les particularités métaboliques de chaque tissu, que d'un point de vue médical.

La glycolyse est en effet le reflet de l'activité cellulaire d'un organe et sera perturbée si une affection quelconque modifie le métabolisme d'une cellule. Le déficit en G-6-PD, PK ou PFI au cours d'anémies hémolytiques, l'aldolasémie fortement augmentée dans certaines myopathies, l'élévation prolongée du taux de la LDH sérique après infarctus du myocarde, et toutes les modifications rencontrées dans les affections hépatiques ou rénales... nous ont conduits à lui consacrer cette thèse qui réunit quelques techniques de dosage et en indique les écueils.

Nous nous sommes proposés, dans ce travail, de discuter le mode de prélèvement tissulaire et d'étudier la stabilité des enzymes. Cela nous a conduits à mettre au point des techniques permettant de doser en série et dans un délai très bref, l'ensemble des enzymes de la voie d'Embden Meyerhof et des

deux déshydrogénases du shunt des pentoses sur un prélèvement tissulaire de faible volume. Ces techniques ont évidemment nécessité une standardisation très poussée des réactifs utilisés et une étude minutieuse de l'influence des conditions du milieu. Nous donnerons le maximum de détails pratiques concernant tant le dosage que les multiples problèmes posés par l'expression, la comparaison et l'interprétation des résultats.

En dernier lieu, nous mettrons en évidence l'intérêt de ces techniques pour la pathologie.

Chapitre 1

LA CINETIQUE ENZYMATIQUE

I - DEFINITION DE L'UNITE ENZYMATIQUE

L'activité d'un enzyme est habituellement exprimée par la vitesse de la réaction qu'il catalyse dans des conditions étroitement déterminées.

On définit l'unité enzymatique comme la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation de une micromole de substrat par minute ; l'activité enzymatique molaire (A.E.M.) comme le nombre de molécules de substrat transformées par une molécule d'enzyme et par minute.

II - LA REACTION ENZYMATIQUE

Dans la combinaison (ES) du schéma classique de la réaction enzymatique :



les sites actifs de l'enzyme sont occupés par les molécules de substrats (S). Cette combinaison se décompose en régénérant l'enzyme (E) et en faisant apparaître les produits de décomposition du substrat.

La vitesse globale de la réaction est fonction :

- de la concentration en enzyme,
- de la concentration en substrat,

- de l'affinité de l'enzyme pour le substrat.

D'autres modifient cette vitesse :

- la température,

- les effecteurs.

1° Influence du rapport Enzyme/Substrat (1) (2) (3)

La vitesse de la réaction tend vers un maximum ($V_{\max}$) quand on élève la concentration en substrat (Fig 1) à chaque instant, la vitesse de la réaction est définie par la relation :

$$v = \frac{V_{\max} (S)}{K_m + (S)}$$

(1) Formule de MICHAELIS

K_m = Constante de MICHAELIS

Si dans cette formule, on pose :

$$v = \frac{V_{\max}}{2}$$

on obtient :

$$K_m = (S)$$

La constante de Michaelis est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de la vitesse maximum. Comme de nombreux autres facteurs influencent la vitesse de réaction, K_m n'est une constante que dans des conditions très déterminées (4) (5) (6) (7).

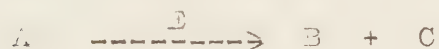
Si la concentration en substrat est grande par rapport à K_m :

$$v = V_{\max}$$

la réaction atteint d'emblée sa vitesse maximum : tous les sites de l'enzyme sont saturés par le substrat et la vitesse de la réaction en fonction du temps est une droite (réaction d'ordre 0). La pente de cette droite ne dépend que de la concentration enzymatique et l'activité est représentée par le nombre de molécules apparues par unité de temps. (Fig 2)

Le plus souvent, la réaction est effectuée avec une concentration en substrat seulement grande par rapport à celle de l'enzyme ; la cinétique répond alors plus ou moins à celle d'une réaction d'ordre 1 (Fig 3) et la vitesse est donnée à chaque instant par la tangente au point considéré.

Soit, par exemple, la réaction :



au temps $t = 0$, il y a :

$$\text{-- Molécules de A} = a$$

$$\text{-- Molécules de B} = 0$$

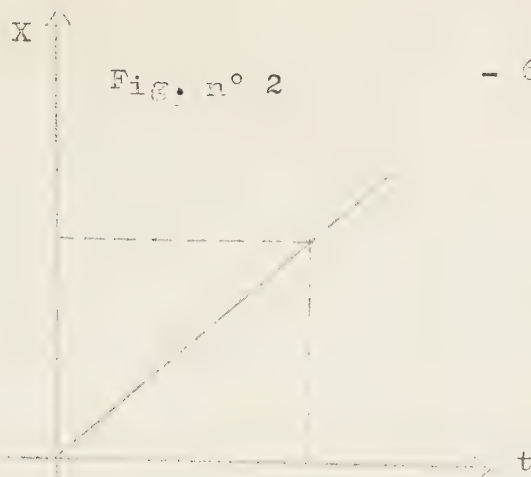
$$\text{-- Molécules de C} = 0$$

au temps t , il s'est formé :

$$\text{-- Molécules de B} = x$$

$$\text{-- Molécules de C} = x \quad \text{et donc :}$$

$$\text{-- } (a - x) \text{ Molécules de A.}$$

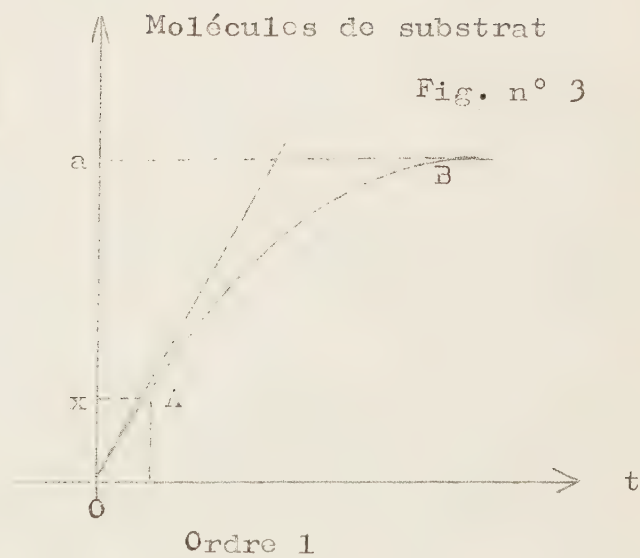
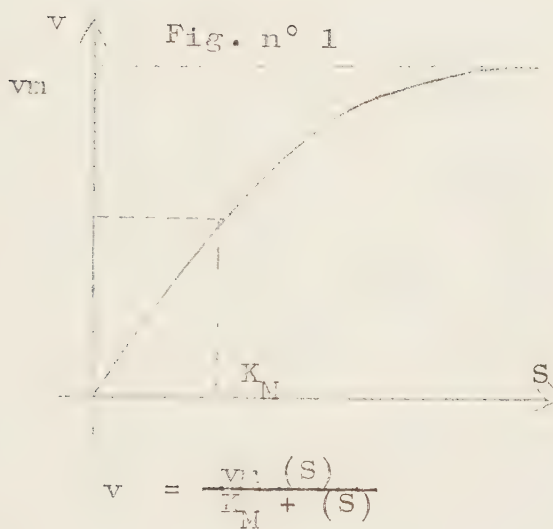


- 6 -

Réaction d'ordre nul

$$v = k$$

$$x = kt$$



$$v = \frac{dx}{dt} = K (a - x) \quad v_i = Ka$$

$$K = \frac{2.3}{t} \log \frac{a}{a - x}$$

D'où la vitesse de réaction :

$$v = \frac{dx}{dt} = K (a - x) \text{ ou après intégration :}$$

$$K = \frac{2.3}{t} \log \frac{a}{(a - x)} \quad (2)$$

(K = Constante de vitesse de la réaction).

Au temps initial $x = 0$, donc

$v = Ka$ représentée par la tangente à l'origine (Fig 3). Elle correspond au temps durant lequel tous les sites actifs de l'enzyme sont saturés par le substrat. Donc, au début, la réaction évolue comme une réaction d'ordre nul.

Les équations (1) et (2) montrent que :

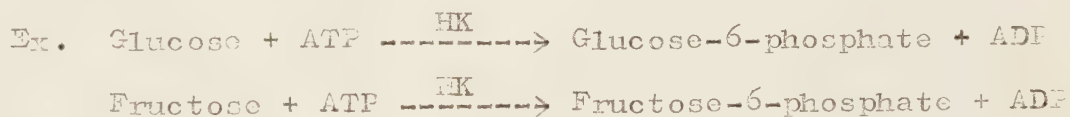
- pour obtenir la V_{max} , il faut une concentration de S très supérieure à K_m .

- d'après les calculs effectués à partir de l'équation (2), tant que 10 % du substrat présent ne sont pas utilisés, la réaction est pratiquement d'ordre nul.

On suppose donc que l'on peut toujours, dans les premiers temps de la réaction, obtenir une cinétique d'ordre nul. Cependant, et pour des raisons diverses, il peut en être autrement. C'est le cas des mesures où un excès de substrat produit un effet inhibiteur, cas de la PFK qui est inhibée par des concentrations trop fortes d'ATP (cosubstrat) ; ou encore de la LDH qui est inhibée à 25° par des concentrations élevées de pyruvate.

2° Choix du substrat

Beaucoup d'enzymes sont spécifiques et n'agissent que sur une liaison bien déterminée, fixant par là même, le choix du substrat : Ex. Le glucose-6-phosphate pour la glucose-6-phosphatase (29). La configuration stérique du substrat a aussi son importance : la fraction isozymique n° 1 de la LDH est spécifique du L (-) lactate et ne réagit pas avec le D (+) lactate (14) (15). D'autres enzymes, au contraire, ont une spécificité beaucoup plus large ; c'est le cas de l'hexokinase qui peut phosphoryler non seulement le glucose, mais également le fructose et le mannose. D'une façon générale, on prendra le substrat pour lequel l'enzyme a le plus d'affinité ($\frac{I}{K_m}$) (8). Cependant, la K_m pouvant varier selon l'origine tissulaire, on peut choisir un substrat selon d'autres critères.



Si la mesure de l'activité se fait par le dosage de l'ADP formé, le choix du substrat est préférable, le G-6-P étant inhibiteur de l'hexokinase (77) (78).

K_m de HK

Levure

Glucose : $1,5 \cdot 10^{-4}$ M

Fructose : $1,5 \cdot 10^{-3}$ M

Mannose : $1 \cdot 10^{-4}$ M

K_m de HK

Cerveau

Glucose : $0,8 \cdot 10^{-5}$ M

Fructose : $150 \cdot 10^{-5}$ M

Mannose : $0,5 \cdot 10^{-5}$ M

3° Influence de la température (9) (10) (11) (5)

L'action de la température sur la réaction enzymatique peut :

- accélérer la vitesse de transformation du substrat,
- ou bien inactiver l'enzyme.

La température optimale est la température au-dessus de laquelle la destruction de l'enzyme l'emporte sur l'accélération de la vitesse de la réaction. Elle se situe souvent entre 40° et 50°. L'idéal est de travailler à 37°, température physiologique pour laquelle la destruction de l'enzyme est pratiquement nulle et la vitesse de réaction suffisamment grande.

Toutefois, pour des raisons de commodité, les mesures sont en général faites à 25°, température du laboratoire, ce qui présente au moins deux inconvénients :

1 - En s'écartant des conditions physiologiques, les résultats peuvent être faussés, ainsi, à 25°, la LDH est inhibée par des fortes concentrations de pyruvate. Elle ne l'est plus à 37° (12).

2 - Les variations de $\pm 5^\circ$ de la température du laboratoire

s'opposent à la reproductibilité des résultats d'un jour sur l'autre. Ainsi, la mesure d'activité de la LDH sérique effectuée entre + 18° et + 28° révèle dans cette zone, pour une augmentation de 1°, un accroissement d'activité de 6 %. Il est alors théoriquement facile de corriger les résultats.

Connaissant la valeur de l'énergie d'activation E_a pour chaque enzyme et la température du laboratoire, il est possible de ramener l'activité à + 25°, en appliquant l'équation d'ARRHENIUS :

$$2.3 \log \frac{V_2}{V_1} = \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

E_a = Energie d'activation en Cal/Mole.

V_1 = Vitesse de la réaction à la température absolue T_1 .

V_2 = Vitesse de la réaction à la température absolue T_2 .

L'énergie d'activation de la LDH étant de 11000 Cal/Mole, la différence d'activité relative est aux environs de 30°, de 6 % pour une différence de 1°, 13 % pour 2°, et 80 % pour 10°. Il est donc indispensable lorsque l'on présente un résultat :

- soit de préciser la température observée au moment du dosage,
- soit de faire une correction pour rapporter la valeur trouvée à + 25°.

4° Influence du pH (5) (13)

L'étude des variations de l'activité enzymatique en fonction du pH révèle l'existence de deux valeurs limites au delà desquelles l'action est nulle. Entre ces deux pH, l'activité présente un maximum pour une valeur bien déterminée dans des conditions particulières (pH optimum). Cet optimum peut varier en fonction de la nature du substrat, de sa concentration, de la température et de l'origine de l'enzyme.

Ex. La LDH : cinq fractions isozymiques ont été identifiées dans cet enzyme, dont les concentrations relatives varient selon les tissus.

- A 25° et pH 8.3 - La fraction I (LDH I) est rapidement inhibée par des concentrations faibles de substrat :

Lactate : 0.05 M ;

- La fraction 5 (LDH 5) par contre, résiste très bien à l'inhibition jusqu'à des concentrations voisines de 0.25 M.

- A 25° et pH 7 - La LDH I perd 50 % de son activité en présence de lactate 0.1 M.

- La LDH 5 pour 0.25 M.

Cependant, à 40°, le comportement de LDH I et LDH 5 est pratiquement identique et l'inhibition par le substrat considérablement diminuée. Donc, si les mesures sont effectuées à + 25°, on devra changer les concentrations du substrat selon

le pH, et l'origine tissulaire de l'enzyme. Ainsi, à 27°, pH 8.3, pour doser la LDH du globule rouge (riche en LDH I) on utilisera une concentration en substrat inférieure à la concentration optimale pour son dosage dans le foie (riche en LDH 5) (12).

5° Influence des effecteurs

Beaucoup d'enzymes sont sensibles à la présence de certains ions, principalement des cations métalliques divalents ou monovalents agissant comme activateurs ; ces ions métalliques se trouvent le plus souvent parmi les suivantes : K^+ , Mg^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} .

Il faut ranger dans une classe à part les ions des métaux lourds (mercure et plomb) qui non seulement inhibent mais inactivent la plupart des enzymes. La mesure des activités enzymatiques se faisant dans des conditions optimales, il faut extraire les inhibiteurs ou les rendre inactifs ; et ajouter les activateurs. C'est ainsi que les agents chélateurs (EDTA) peuvent activer certains enzymes, les métaux lourds en particulier ; c'est encore le cas de l'hexokinase qui voit son activité considérablement augmentée par l'addition de Cl_2Mg .

Nous terminerons en faisant remarquer que les mesures sont effectuées dans des conditions optimales : concentration en substrat et en coenzyme, pH ... qui ne sont pas nécessairement celles de la cellule.

Dans un ml d'hémolysat, l'activité de l'hexokinase est de huit à dix micromoles par heure, alors que la consommation de glucose, mesurée à pH 7.4 dans des conditions les plus physiologiques possibles, est de 0.6 micromole par ml de globule rouge, soit le 1/15ème de l'activité d'un des enzymes les plus faibles de la glycolyse.

Chapitre 2

GLYCOLYSE ET CARACTERISTIQUES

I - GENERALITES

Lépine (18), en 1909 a dénommé glycolyse la dégradation des glucides dans les tissus. En 1923, Warburg (19) a limité l'emploi de ce terme à la dégradation en anaérobiose aboutissant à la formation d'acide lactique.



Glucose

Acide lactique.

Tous les tissus glycolysent en anaérobiose. En présence d'oxygène, la formation d'acide lactique est freinée (effet Pasteur), la dégradation conduisant alors au pyruvate qui est métabolisé dans le cycle tricarboxylique :



Lorsque l'apport d'oxygène est suffisant, la plupart des tissus ne forment pas d'acide lactique. En réalité, Warburg (20) (21) a montré qu'un tissu tumoral produit cet acide : la respiration étant la marque de la croissance cellulaire ordonnée et la glycolyse en anaérobiose celle de la croissance anarchique ; le tissu embryonnaire sain, manifeste par exemple, une glycolyse en aérobiose élevée.

2 - ETAPES DE LA GLYCOLYSE EN ANAEROBIOSE

La principale voie glycolytique a été surtout élucidée par les travaux de l'école de Meyerhof.

Les oses ne peuvent être utilisés par la cellule qu'après avoir été phosphorylés. Pour chacun de ces sucres, un enzyme spécifique est nécessaire pour catalyser la phosphorylation et l'ATP joue le rôle de donneur de phosphate. Ainsi, le glucose est transformé en G-6-P par un enzyme spécifique : la glucokinase (13)

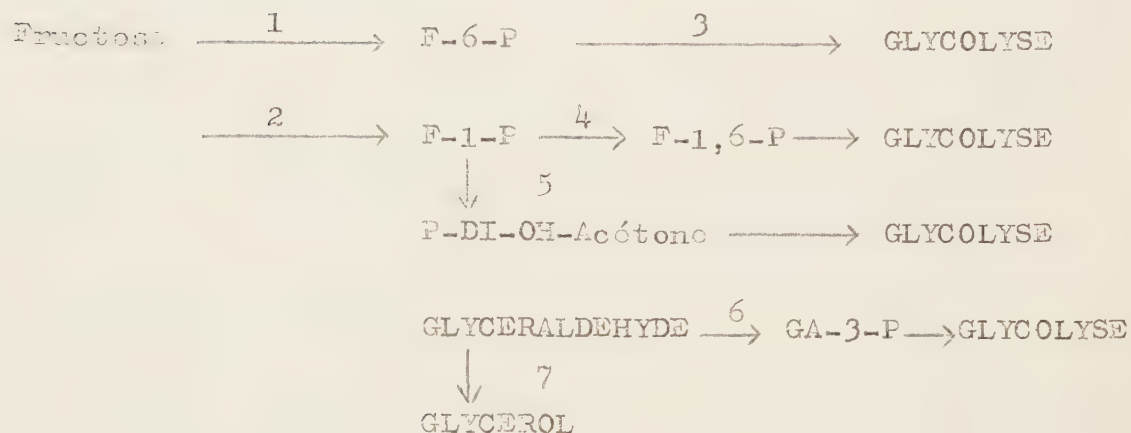
L'entrée du fructose (30) dans la glycolyse se fait de deux manières différentes :

- soit par action de l'hexokinase et formation de F-6-P
(31)

- soit action de la fructokinase dans le foie et l'intestin et formation de F-1-P puis de F-1,6-DP. Le F-1-P peut aussi être hydrolysé en phospho-di-hydroxy-acétone et glycéraldéhyde libre, lequel est partiellement estérifié en 3-phospho glycéraldéhyde ou transformé en glycérol par

(NB) Récemment, on s'est aperçu qu'il fallait faire une distinction entre glucokinase (72) (73) : enzyme spécifique du tissu hépatique et hexokinase qui est présente dans tous les tissus, y compris le foie, et qui peut également phosphoryler le fructose, le galactose et le mannose. La glucokinase a une faible affinité pour le glucose (74) (75) (76), l'hexokinase une affinité élevée ; cependant, quand le glucose arrive au niveau du foie (glycémie physiologique 50 à 300 mg pour 100 ml) sa concentration se trouve dans la zone où la glucokinase a une vitesse de réaction très sensible aux variations de la glycémie, alors que celle de l'hexokinase ne l'est pas.

ENTREE DU FRUCTOSE DANS LA GLYCOLYSE



- 1 - Hexokinase
- 2 - Fructokinase
- 3 - Phospho-fructo-kinase
- 4 - Phospho-1-fructose-phosphokinase
- 5 - Fructose-1-phosphate-aldolase
- 6 - Triose kinase
- 7 - Reductase et glycéro-kinase

Schéma 1

le jeu d'une réductase ou d'une glycérokinase (schéma 1).

Le mannose phosphorylé par l'hexokinase en mannose-6-phosphate peut rentrer dans la glycolyse, grâce à une isomérase qui le transforme en un mélange de glucose-6-phosphate et de fructose-6-phosphate (98).

Sans étudier les différentes réactions de la chaîne glycolytique, nous nous contentons de donner le schéma général avec les enzymes qui y participent (schéma 2).

3 - LES REACTIONS IRRÉVERSIBLES

Trois réactions dans la glycolyse sont irréversibles :

- La transformation du G-6-P en glucose exige un enzyme spécifique : la glucose-6-phosphatase que l'on rencontre dans le foie et dans le rein : sa rareté dans le muscle explique que ce tissu ne puisse libérer de glucose libre dans le sang.

- La reconversion du F-1,6-DP en Fructose-6-P exige la présence d'un 2ème enzyme : la F-1,6-DPase. Sa répartition dans les tissus est comparable à celle de la G-6-Pase (le muscle en contient cependant).

- la réversibilité de l'action de la pyruvate kinase en présence d'ATP ne semble possible que dans le muscle. Dans les autres tissus, le passage du pyruvate au PEP se fait en plusieurs étapes (Cycle de Utter).

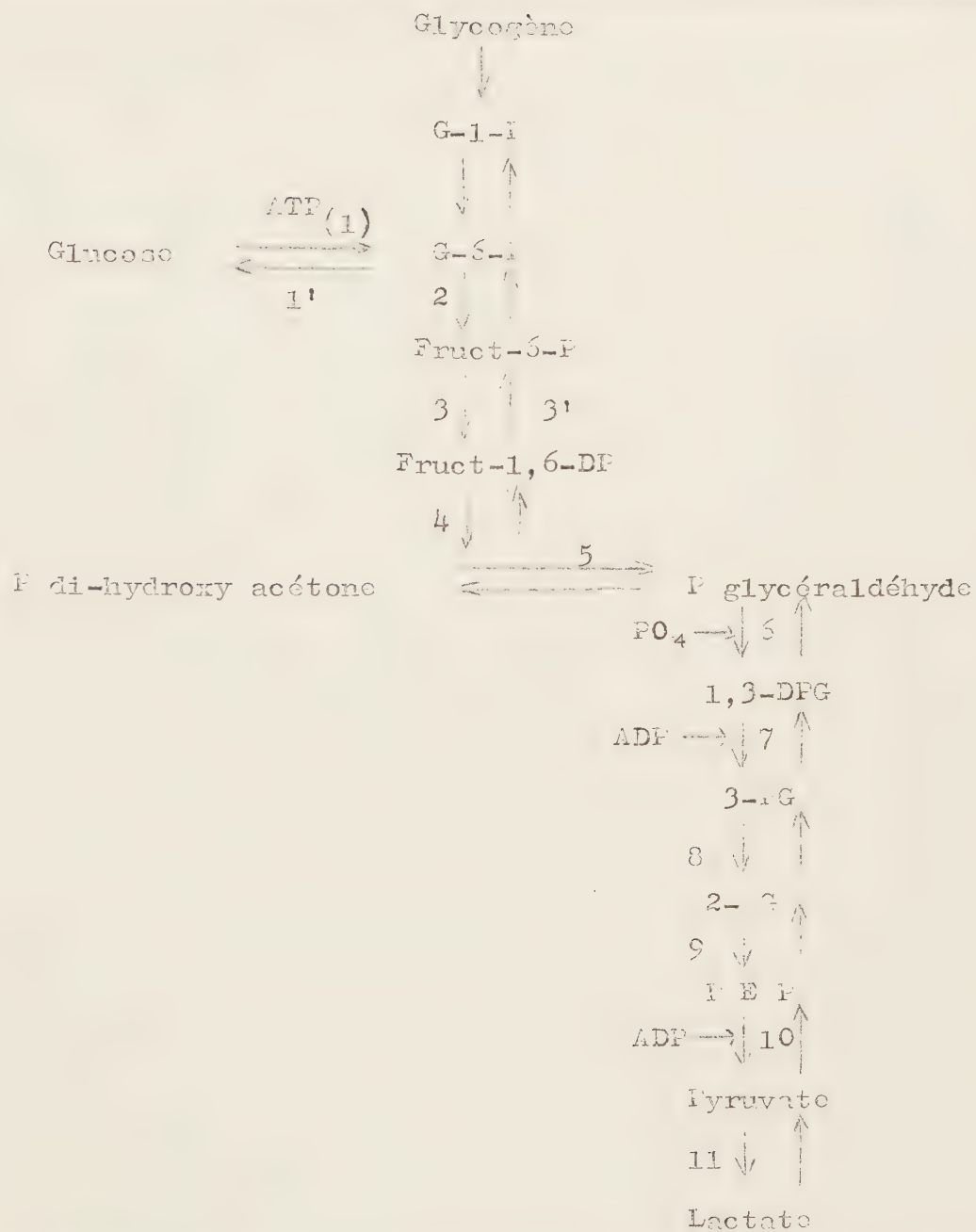


Schéma 2 - Glycolyse : Voie d'Embden Meyerhof

1 - Glucokinase	GK
1' - Glucose-6-phosphatase	G-6-Pase
2 - Phospho-hexo-isomérase	PHI
3 - Phospho-fructo-kinase	PFK
3' - Fructose-1,6-diphosphatase	F-1,6-DPase
4 - Fructose-1,6-diphosphate aldolase	Aldo
5 - Triose phosphate isomérase	TPI
6 - 3-phospho glycéraldéhyde déshydrogénase	GAPD
7 - Phospho-glycérate kinase	PGK
8 - Phospho-glycérate mutase	PGM
9 - Enolase	Eno
10 - Pyruvate kinase	PK
11 - Lactico-déshydrogénase	LDH

4 - ETAPES LIMITANTES DE LA GLYCOLYSE

Si on introduit une réaction enzymatique dans une chaîne de réaction, sa vitesse est alors réglée par celle à laquelle le substrat S est introduit et par celle à laquelle les produits disparaissent. Comme les intermédiaires de la chaîne ne s'accumulent pas, chaque produit va devenir substrat pour la réaction suivante et toutes les réactions auront en réalité la même vitesse.

Il s'en suit que la vitesse globale de la chaîne enzymatique doit être fixée par les réactions dont l'activité mesurée in vitro ont les valeurs les plus faibles.

Ainsi, la phosphorylation hexokinasique du glucose par l'ATP (34), la phosphorylation du F-6-P en F-1,6-DP par la PFX (35) constituent des étapes régulatrices limitant la glycolyse ; ces deux réactions ont en commun, outre leurs faibles activités, leur dépendance vis-à-vis d'un donneur à haut potentiel énergétique, toutes deux sont irréversibles et sensibles à des effecteurs allostériques.

Il faut, par ailleurs, pour que la dégradation du glucose soit possible :

- qu'il y ait de l'ATP (52) (54) (55)
- qu'il y ait du PO_4 (17) (48) (49) (50) (51) (53) (16).

Le taux de chacun de ces produits règle pour une grande part, l'intensité de la glycolyse.

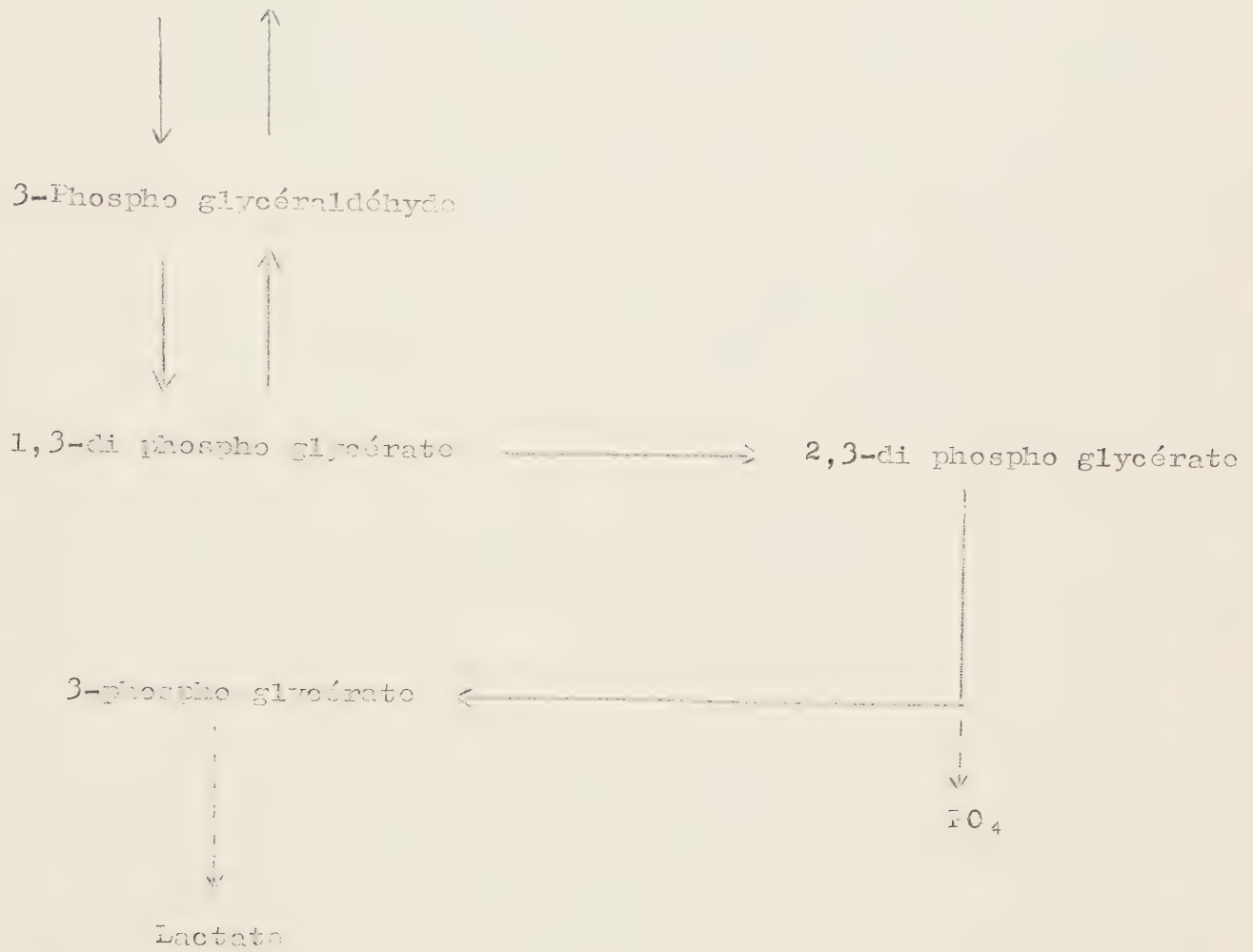
Cas particulier de la glycolyse dans le globule rouge.

Le facteur limitant la glycolyse dans le globule rouge ne semble pas être la concentration en PO_4 , mais plutôt le taux d'ADP, pour avoir en disponibilité une plus grande réserve d'ADP, l'hématie emprunte un schéma légèrement différent. Le 1,3-diphosphoglycérate se transforme en 2,3-diphosphoglycérate qui normalement s'accumule ; ce dernier, en cas de déplétion glucidique de la cellule est diphosphorylé en acide phospho-3-glycérique qui rejoint alors la voie normale, une liaison riche en énergie est alors perdue : la recharge d'ATP qui intervenait dans la voie d'Embden Meyerhof au stade d'oxydation du triose phosphate ne se fait pas. Ce court-circuit dans la glycolyse porte le nom de "Cycle de Rapoport-Luebering" (Schéma 3) (35) (37) (38) (39) (40).

5 - VOIE DES PENTOSE PHOSPHATES

Jusqu'en 1951, il était généralement admis que la glycolyse était le seul mécanisme de dégradation intervenant. Cependant les travaux de Warburg et Christian (33), de Lipmann et de Dickens (22) avaient montré de 1933 à 1938 que les levures possèdent un système enzymatique fonctionnant avec le TPN et oxydant le G-6-P en acide-6-phospho-gluconique, l'oxydation pouvant aller au delà de cet ester.

Depuis 1950, de nombreux travaux (24) (25), parmi lesquels



Cycle de Rapoport - Luebering

Solima 3

il faut citer ceux d'Horecker (23) (28), ont précisé les différentes étapes de ce mécanisme dont l'existence a pu être démontrée chez les animaux, les végétaux et certaines bactéries.

Les principales étapes sont résumées dans le schéma 4.

On peut diviser ce schéma en trois parties :

1 - Deux déshydrogénases successives avec formation de 2 TPNH_2 . Cette formation de TPNH_2 est importante pour différentes réactions de réduction ou d'hydroxylation qui n'admettent que le TPNH_2 comme donneur d'hydrogène (biosynthèse des acides gras, hydroxylation des stéroïdes)

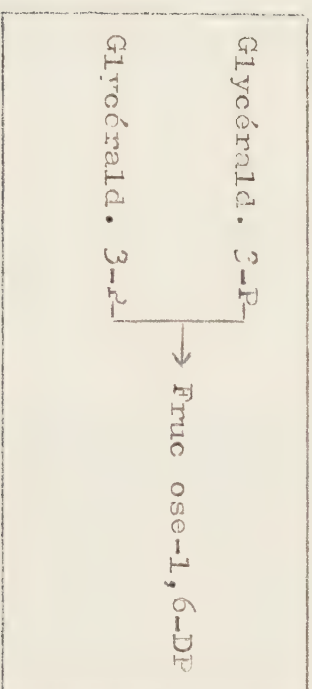
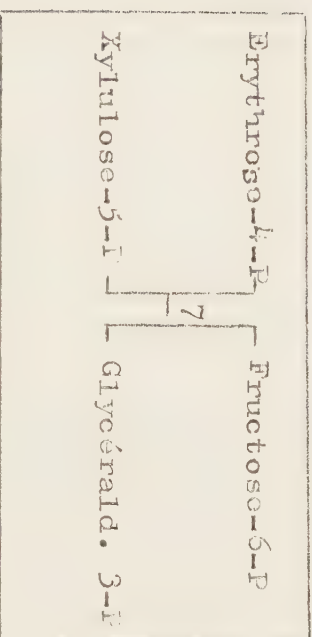
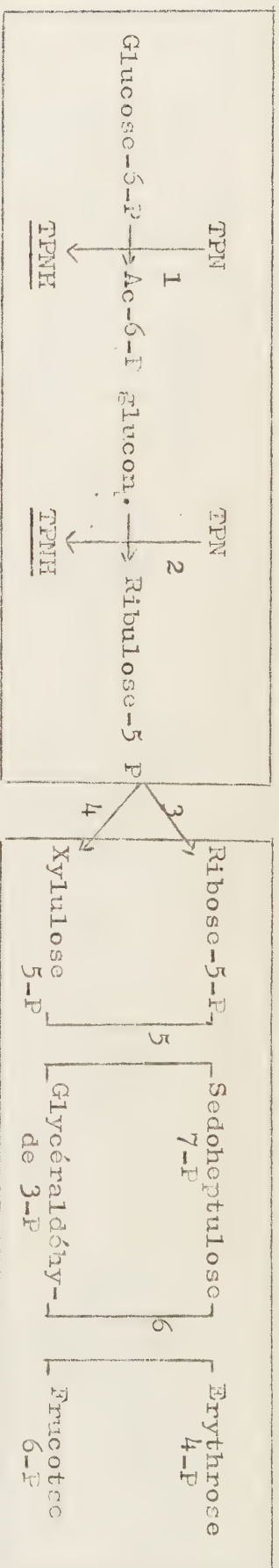
2 - A partir d'un sucre en C_6 , on parvient à un composé à 5 C par décarboxylation et par isomérisation.

L'ensemble des réactions de ces deux premières parties permet de passer des hexoses phosphates aux pentoses phosphates qui serviront pour la synthèse des nucléosides, des nucléotides et des acides nucléiques (41)

3 - Une suite de réactions réversibles de transfert de termes en C_2 et C_3 permettant de passer au F-6-P et au 3-P glycéraldéhyde.

L'ensemble de ces trois parties constitue le shunt des hexoses monophosphates.

Les cellules qui ne peuvent réaliser les réactions de la première partie peuvent aussi synthétiser le ribose-phosphate grâce aux réactions réversibles de la troisième partie qui permettent depuis le 3-phosphoglycéraldéhyde et le



- 1- Glucose-6-P déshydrogénase
- 2 - 6- P gluconique déshydrogénase
- 3 - Ribulose-5-P isomérase
- 4 - Ribulose-5-P épimérase
- 5 - Transcétolase
- 6 - Transaldolase
- 7 - Transcétolase.

fructose-6-phosphate de passer aux pentoses phosphates (32)

Cette voie est souvent appelée voie oxydative des hexoses monophosphates. En réalité, aucune étape ne requiert de l'oxygène et tout le cycle peut s'accomplir en anaérobiose.

La voie des pentoses doit être considérée, comme une branche de dérivation, dont les produits terminaux peuvent rejoindre la voie générale d'Embden Meyerhof.

6 - REPARTITION DU CATABOLISME GLUCIDIQUE ENTRE LA VOIE D'EMBDEN MEYERHOF ET LA VOIE DES PENTOSSES

Dans la majorité des tissus (muscle, rein, cerveau, diaphragme ...) la dégradation du glucose par la voie des pentoses n'excède pas 5 à 10 %.

Le facteur qui, à l'intérieur d'un tissu règle l'intensité du shunt semble être non pas tant le besoin en pentoses (43) (44) (45) (46), que le besoin en TPNH et la faculté de réoxydation du TPNH_2 (42) : si à un hémolysat de globules rouges, on ajoute du bleu de méthylène qui a la propriété de réoxyder le TPNH_2 , la voie des pentoses est considérablement augmentée.

Le rapport entre voie des pentoses et voie d'Embden Meyerhof peut également être influencée par le pH intracellulaire ; en effet, en acidose l'activité de la PFK est nettement diminuée et la proportion du glucose empruntant

Le shunt se trouve augmentée, d'autant plus, du reste, que l'équilibre acido-basique est susceptible d'influencer la réoxydation du TPNH, donc de modifier la répartition du glucose empruntant la voie oxydative (47).

7 - LOCALISATION CELLULAIRE DE LA GLYCOLYSE

La dégradation du glucose se situe essentiellement dans le cytoplasme. Le tableau suivant emprunté à LEPAGE et SCHNEIDER (1948) (56) (57) (58) donne le pourcentage de glycolyse dans les différentes fractions cellulaires hépatiques. Le cytoplasme et les noyaux ont une activité à peu près égale à 80 %, donc la glycolyse n'est pas seulement limitée au surnageant cellulaire. Si l'aldolase est presque entièrement présente (96 % dans le surnageant), les microsomes contiennent une forte proportion de glucose-6-phosphatase (26), une centrifugation à 18 000 g (27) sédimente :

- 90 % de l'hexokinase cérébrale
- 73 % de l'hexokinase de la muqueuse intestinale
- 52 % de l'hexokinase du coeur
- 47 % de l'hexokinase du rein
- 25 % de l'hexokinase du foie
- 0 % de l'hexokinase du globule rouge.

Cependant, la mesure des activités enzymatiques est généralement effectuée sur le surnageant cellulaire, c'est de cette façon que nous avons entrepris l'étude des enzymes de la glycolyse.

POURCENTAGE D'ACTIVITE GLYCOLYTIQUE
DANS LES
DIFFERENTES FRACTIONS CELLULAIRES HEPATIQUES

FRACTIONS	POURCENTAGE
H (Homogénat)	100 %
N _w (Noyaux)	12.6 %
M _w (Mitochondries)	0 %
P _w (Fract submicro)	2.7 %
S ₂ (Surnageant)	52.7 %
N _w + M _w	13.4 %
N _w + P _w	27.8 %
N _w + S ₂	76 %
M _w + P _w	8.8 %
M _w + S ₂	58.6 %
P _w + S ₂	94.9 %
N _w + M _w + P _w + S ₂	104.8 %

Extrait à 10 % dans saccharose 0.25 M.

(Le Page et Schneider, 1948)

Enzyme	Sour ce	pH opti- ma	Cofacteur ou cosubstrat	K_M substrat	K_M Coenzyme K_M ATP ou ADP
HK	GR	8.3	Mg^{++} ATP	Glu $5,5.10^{-5}$ M	ATP 1.10^{-3} M
GK	Foie		Mg^{++} ATP	Glu $1,8.10^{-2}$ M	ATP $4,9.10^{-4}$ M
PHI	GR	8.4		F-6-P 5.10^{-4} M G-6-P $2,5.10^{-4}$ M	
PFK	GR	8.5	ATP PTI UTP	F-6-P $5,2.10^{-5}$ M	ATP $1,8.10^{-5}$ M ITP 7.10^{-5} M UTP $3,3.10^{-5}$ M
ALDO	GR	8.1		FDP $1,2.10^{-5}$ M	
PTI	GR	8.4		GA-3-P 4.10^{-4} M	
GAPD	GR	8.6	DPN	GA-3-P $7,7.10^{-5}$ M	DPN $2,8.10^{-4}$ M
PGK	GR	7.2	Mg^{++}	3-PG $2,8.10^{-4}$ M	ATP $4,3.10^{-4}$ M
PGM	GR	6.7	2,3-DPG	3-PG 9.10^{-4} M	
ENO	GR	7.2	Mg^{++}	2-PG 6.10^{-5} M	
PK	GR	7.6	Mg^{++} et K^+	MEP $3,4.10^{-6}$ M	ADP 1.10^{-5} M
LDH	GR	7.2		Pyr $9,5.10^{-5}$ M	DPNH $1,2.10^{-5}$ M
G-6-PD	GR	8.7		G-6-P 3.10^{-5} M	TPN $1,3.10^{-5}$ M
6-PGD	GR	8.6		6-PG 9.10^{-5} M	TPN $2,4.10^{-5}$ M
PHM	Foie	7.5 et 9		G-1-P $2,4.10^{-5}$ M G-1,6-DP 5.10^{-5} M	

Enzyme	K _{eq}	Inhibiteurs	Activateurs
HK	$\frac{(G-6-P)}{(G)} \frac{(ADP)}{(ATP)} = 1,6.10^2$ à pH = 6	ADP - G-6-P - G-1,6-DP	EDTA - Cystéine - Mg ⁺⁺
GK		ADP Ph ^o chloromercuriben- zoate	KCl (?)
PHI	$\frac{(G-6-P)}{(F-6-P)} = \frac{7}{3}$	5-PG - Mannose-6-P - glucosamine-6-P Hg ⁺ - Zn ⁺⁺ - CN ⁻	
PFK		Citrate-Mg-ATP-Ag ⁺ -Cu ⁺⁺ Hg ⁺⁺	EDTA - ADP - FDP - Mg ⁺⁺ - 3'5'AMP- 5'AMP
ALDO	$\frac{(\text{TrioseP})(\text{TrioseP})}{(F-1,6-DP)} =$ 1,5.10 ⁻³	Ag ⁺ -Cu ⁺⁺ -Zn ⁺⁺ -cystéine	
PTI	$\frac{(DHAP)}{(GA-3-P)} = 22$	PO ₄ ⁻⁻⁻	
GAPD		Iodacetate-Métaux lourds oxydants-p.chloro mercu ribenzoate	EDTA - Cystéine
PGK	$\frac{(ATP)(3-PG)}{(ADP)(1,3-DPG)} = 3,3.10^{-3}$		Mg ⁺⁺ -Mn ⁺⁺ -Ca ⁺⁺ - Fe ⁺⁺
PGM	$\frac{(3-PG)}{(2-PG)} = 4,5$	Zn ⁺⁺ - Cu ⁺⁺	
ENO	$\frac{(PEP)}{(2-PG)} = 2,5$	F ⁻ - Ca ⁺⁺ - métaux lourds	Mg ⁺⁺
PK	$\frac{(1-Pyr)(ATP)}{(PEP)(ADP)} = 200$	Ca ⁺⁺	K ⁺ - Mg ⁺⁺
LDE	$\frac{(Pyr)(DHAP)(H^+)}{(Lact)(D.H)} = 10^{-11}$	Pyruvate-Ph ^o chloromer curibenzoate	
PFM	$\frac{(G-1-P)}{(G-6-P)} = \frac{5}{95}$	Zn - Fluorures	Mg ⁺⁺ - Cystéine - EDTA
G-6-PD	$\frac{(TPNH)(H)(G-6-P)}{TIN} = 1,22$ pH 6.4	o. iodobenzoate - Hg ⁺ Ph ^o chloromercuriben- zoate	Ca ⁺⁺ - Mn ⁺⁺ - Mg ⁺⁺ Cystéine
5-PGD	$\frac{\text{Ribulose-5-P}(CO_2)(TPNH)}{(6-PG)(TIN)}$ $= \frac{65}{35}$	NAD ⁺ - ATP - Hg ⁺ - Zn ⁺ Cu ⁺ - Cystéine	Cystéine - Ca ⁺⁺ Mu ⁺⁺ - Mg ⁺⁺

Chapitre 3

EXTRACTION ET STABILITE DES ENZYMES

L'extraction et la préparation des extraits constituent un temps capital dans le dosage des enzymes.

I - PRELEVEMENT TISSULAIRE

1 - Le sang

1) Le plasma

Les activités glycolytiques du plasma sont très faibles : la plupart des enzymes de la voie d'Embden Meyerhof ont des activités à peine décelables chez le sujet normal. Ces enzymes sont de manière générale, peu affectés par les anticoagulants (bien que les oxalates inhibent la LDH).

2) Les globules rouges

Le sang est recueilli sur héparine (100 à 200 UI soit 1 à 2 mg) pour 100 ml de sang) à + 4°. Après aspiration du plasma et de la couche leucocytaire, les globules rouges sont lavés deux fois avec du C1Na 0.154 M, puis hémolysés par deux congélations successives ; enfin, dilués au 1/10 dans de l'eau bidistillée refroidie.

Si l'on désire se rapporter au volume de globules rouges, il est nécessaire de déterminer la valeur de l'hématocrite sur le culot érythrocytaire afin de tenir compte du milieu de

lavage inclus. Il est plus simple de déterminer l'hémoglobine de l'hémolysat et de rapporter à cette dernière valeur ou d'en déduire le volume globulaire.

Les globules blancs et les plaquettes nécessitent des techniques de préparation particulières qui sont détaillées par Bergmeyer (59).

B - Les tissus

Lorsqu'il s'agit d'un prélèvement opératoire ou d'un fragment biopsique, on ne peut éviter un certain délai avant l'extraction. Les échantillons doivent être congelés très rapidement, soit dans l'air liquide, soit sur la neige carbonique par l'intermédiaire d'un carré de parafilm. Le fragment doit être conservé à une température inférieure à -20° (60) (61). Il semble toutefois que l'organe entier, après la mort du sujet (pièce d'autopsie) conserve des activités enzymatiques normales pendant plusieurs heures (60) (61).

Il est nécessaire d'éliminer, dès le prélèvement, la contamination sanguine en pressant entre compresses le fragment et il peut être utile, pour apprécier cette contamination de pratiquer un dosage d'hémoglobine sur l'extrait. Schmidt (62) indique les pourcentages de contamination sanguine suivants :

-- Foie	1.7 %
-- Muscle cardiaque	3.7 %
-- Muscle squelettique	10.3 %

- Tissu adipeux	3 %
- Poumon	20.6 %
- Rein	5.6 %

L'hémoglobine est dosée par les méthodes spectrophotométriques classiques. A très faibles concentration, Antoine (63) a proposé une technique basée sur l'activité peroxydasique.

Les fragments biopsiques posent, par ailleurs, un problème particulier en raison de leurs faibles dimensions.

Il faut, par exemple, au minimum 50 mg de foie pour obtenir un spectre glycolytique complet. La biopsie chirurgicale permet d'obtenir facilement ce volume, mais il n'en est pas toujours de même pour la biopsie transpariétale.

II - LA PREPARATION DES EXTRAITS

Cette préparation impose le choix

- du milieu d'extraction
- de la technique de broyage
- de la vitesse et de la durée de centrifugation.

1) Choix du milieu d'extraction.

Pour conserver morphologiquement et fonctionnellement les structures, le milieu idéal doit se rapprocher le plus possible de la phase soluble du cytoplasme : concentration osmotique, force ionique, pH et pouvoir tampon. Il doit assurer la dispersion parfaite des particules, posséder une faible viscosité et ne pas gêner les analyses ultérieures, tout en

assurant une conservation optimale des enzymes jusqu'au terme du dosage.

a) Solution d'acide citrique

Non tamponnées, elles furent longtemps employées pour la séparation des noyaux, cependant ne préservant pas les enzymes, elles n'ont que peu d'intérêt en enzymologie.

b) Les solutions non ioniques

La solution la plus utilisée est le saccharose à diverses concentrations. En 1948, Hogeboom et coll (71) montrèrent que dans le saccharose 0.88 M, les mitochondries bien dispersées, maintenaient leur forme de batonnets. A cette concentration, c'est le milieu de choix pour l'établissement de la constitution chimique des structures (Chauveau et Clément, 1951). Ses inconvénients sont, outre sa densité et sa viscosité notable qui obligent à des centrifugations prolongées à grande vitesse, l'inhibition partielle de certains enzymes ; tels l'oxydase de l'acide octanoïque (Schneider) ou l'enzyme de la synthèse de l'acide para-aminohippurique (Kielly et coll). En 1951, Hogeboom proposa le saccharose 0.25 M isotonique qui bien que provoquant le gonflement des mitochondries, laisse intactes les activités enzymatiques. Avec un tel milieu, il n'a pu être démontré une diminution des activités enzymatiques glycolytiques.

Le mannitol isotonique (0.25 M) présente les memes

avantages. Toutefois, le pH de l'homogénat s'abaissant au cours du temps par suite de l'autolyse, ces solutions non tamponnées ne sont pas idéales pour le dosage des activités enzymatiques ou les variations de pH ont un effet parfois considérable.

Il serait donc logique d'employer des solutions tamponnées, mais l'introduction de sels dans le milieu provoque généralement une agglutination des particules. Cet inconvénient, qui empêche leur emploi pour l'étude des mitochondries par exemple, n'existe pas lorsque l'on dose les activités enzymatiques des liquides cytoplasmiques.

c) les solutions salines

Les solutions salines tamponnées ou non semblent s'imposer : elles agglutinent les structures ; en additionnant les mitochondries forment des amas qui centrifugent avec les noyaux pour de faibles valeurs de g. Par ailleurs, elles favorisent l'extraction de certains constituants particuliers : les acides nucléiques par exemple.

Nous avons adopté un milieu salin légèrement alcalin (la G-1-PD et la PFK requiert un pH aux environs de 7.5 - 8.5 pour leur stabilité), additionné d'EDTA (60) et de mercapto-ethanol : l'EDTA supprime le risque d'inhibition de certains enzymes par les métaux lourds, le mercapto ethanol protège les thio enzymes particulièrement fragiles.

- KCl 0.15 M

- KHCO_3 0.05 M

- Na_2H_2 EDTA 0.006 M

- Ajuster à pH 8.5

Le mercapto ethanol, en solution, étant instable, est ajouté immédiatement avant l'extraction :

5 μl pour 5 ml (concentration finale : 0.018 M)

2) Technique de broyage

a) Principes généraux

Le problème est de broyer, si possible, la totalité des cellules, en ne provoquant que le minimum de lésions aux structures et en particulier aux noyaux qui sont les plus sensibles en raison de leur taille et qui contiennent une activité glycolytique importante.

L'homogénéisation doit être effectuée rapidement et à basse température.

b) Techniques

Parmi les homogénéiseurs décrits, l'appareil le plus classique est celui de Potter et Elvehjem (99) composé d'un cylindre en verre, en métacrylate (100) ou en téflon (101). C'est ce dernier que nous avons employé.

Le prélèvement tissulaire pesé rapidement et extrait à 0° par dix volumes de milieu d'extraction est homogénéisé en trois périodes de 30 secondes, le tube étant maintenu constamment dans la glace pendant l'opération.

Les mixers (Type Servall omni mixer) ont l'inconvénient de provoquer la rupture de nombreux noyaux et d'endommager

même les mitochondries. Ils peuvent cependant rendre service dans des cas particuliers : extraction des enzymes de l'os, par exemple.

3) La centrifugation

L'extrait doit être centrifugé aux environs de 0° C. Une première centrifugation à faible vitesse et pour quelques minutes élimine débris cellulaires, noyaux et mitochondries, la fine couche lipidique qui surnage est aspirée avec une pipette Pasteur et la couche intermédiaire est soumise à une deuxième centrifugation à 105 000 g pendant 45 minutes ; ce qui fournit un surnageant cytoplasmique parfait.

En fait, quel que soit le type de centrifugation, il est surtout nécessaire de respecter la reproductibilité des conditions de centrifugation.

L'extraction finie, les dosages peuvent être entrepris ; d'une manière générale, on peut les commencer moins de 20 minutes après le prélèvement et l'ensemble des enzymes sont dosés en moins de 2 heures 30 après l'extraction cytoplasmique.

III - STABILITE DES ENZYMES

A - Le mode de prélèvement

Lorsqu'il s'agit d'un prélèvement opératoire, ou d'une biopsie transpariétale, on ne peut éviter un certain délai avant l'extraction.

Deux solutions s'offrent alors :

- Si l'on est assuré que l'extraction ne sera pas trop retardée, le transport dans le laboratoire peut se faire, en immergeant la biopsie dans le liquide d'extraction préalablement refroidi aux environs de 0°. Les enzymes de la glycolyse seront d'autant plus stables que le fragment biopsié sera plus gros. Ce procédé offre probablement de nombreux avantages sur la congélation dans l'air liquide ou sur neige carbonique par l'intermédiaire d'un carré de parafilm. La congélation suivie de décongélation présente en effet, au moins deux inconvénients :

- elle risque de détruire les lysozomes et libérer les enzymes protéolytiques qu'ils contiennent et ceci d'autant plus sûrement que la congélation et la décongélation auront été plus rapides.

- elle abaisse le pH cellulaire, ce qui risque de dénaturer certains enzymes.

- Lorsqu'il est impossible de pratiquer autrement, le fragment doit être conservé à une température inférieure à -20° C. Avec un fragment obtenu par autopsie, il semble que les activités enzymatiques restent stables pendant plusieurs heures, sauf pour la PFK dont l'activité est de deux à cinq fois plus basse sur les pièces d'autopsie. (68).

B - La conservation

Lorsque l'on ne peut éviter un certain délai avant l'extraction, la conservation est obligatoire (NB).

Le tableau 1 montre les limites permises dans la conservation à + 24° de coupes de foie ; six heures après le prélèvement tissulaire, l'activité de la PGK est réduite de 75 % ; celle de la LDH n'est pratiquement pas modifiée. Par contre, si l'on conserve des pièces relativement grandes, ces activités enzymatiques demeurent constantes.

A - 20° C (tableau 2), certains enzymes restent stables (GAPD, PGK) ; d'autres s'inactivent : la LDH et PHI par exemple.

Des homogénats ou leurs surnageants (tableau 3) ne peuvent être conservés pour longtemps dans un bain de glace ou à - 20° C, car les enzymes s'inactivent du fait de leur dilution.

La stabilité varie avec l'origine tissulaire de l'enzyme : la LDH érythrocytaire (riche en LDH 1) est stable pendant plusieurs mois quelle que soit la température ; la LDH du foie ou du muscle (riches en LDH 5) s'inactivent complètement après 15 jours à - 10° C.

(NB) La conservation des tissus présente certains avantages c'est ainsi que le dosage des enzymes de la glycolyse effectuée sur homogénat total, de rein ou de muscle cardiaque, est faussée par la présence d'une DPNH oxydase très active, l'activité de celle-ci disparaît par une congélation prolongée (60)

Tableau n° 1 : Foie de rat, conservation à 24° (activités initiales arbitrairement rapportées à 100)

ENZYMES	TEMPS DE CONSERVATION				
	1/2 h	1 h 30	2 h 30	4 h 30	6 h 30
G-1-PD	100	93	101	101	94
GAPD	100	81	84	82	99
LDH	100	93	99	104	93
PGK	100	83	95	95	25
PK	100	112	108	108	107

Tableau n° 2 : Foie de rat, conservation à - 20°

ENZYMES	TEMPS DE CONSERVATION		
	1/2 h	18 h	186 h
GAPD	100	98	103
LDH	100	78	70
ALDOLASE	100	98	83
PHI	100	45	52
PGK	100	118	104
PK	100	80	60

Tableau n° 3 : Homogénat de foie de rat, centrifugé à 30 000 g, Conservation à 4° et - 20°.

ENZYMES	ACTIVITE INITIALE	ACTIVITE APRES 18 h	
		$\Delta + 4^{\circ}$	$\Delta - 20^{\circ}$
GIPD	100	80	81
GAPD	100	29	45
LDH	100	95	97
PK	100	21	63

Zondag (69) a étudié la LDH du sérum et des tissus et constaté que l'inhibition à basse température est prévenue par addition de NAD à l'extrait, avant congélation. Par ailleurs, l'addition de glutathion réduit (G-S-H) stabilise l'enzyme, et de plus, restaure l'activité quand le G-S-H est ajouté après inhibition de l'enzyme par la congélation. Pour expliquer ce fait, il fait appel à la théorie de Fritz (70) selon laquelle chaque monomère a, attaché à son site actif, une molécule de NAD ; cette molécule, dans certaines conditions (variations de température) est plus facilement détachée de la forme musculaire (M) que de la forme cardiaque (H) ; et le monomère devient ainsi inactif.

Si l'homogénat est plus sensible au froid que le tissu lui-même, c'est que l'homogénéisation détache le NAD du

monomère M, dont le groupement actif sulfhydrile n'est plus protégé contre l'inactivation.

Dans le sérum, la labilité de la LDH est moindre, les groupements de SH étant protégés par les protéines qui remplacent ici le NAD.

Le substrat protège également contre l'inactivation : la GAPD se conserve mieux en présence de GA-3-P, l'hexokinase reste stable plusieurs jours en présence de glucose.

La stabilité étant généralement moindre aux pH acides, on utilise des solutions légèrement alcalines (pH voisin de 7 - 8), et ce, surtout pour l'extraction de la GAPD, PFK, Aldo et LDH. Ainsi, à pH 3, l'aldolase musculaire, la LDH se scindent en subunités. Il est possible, par neutralisation, de réactiver l'aldolase, mais non la LDH qui s'est scindée en fractions particulièrement instables.

Nos études ont portées sur des pièces tissulaires non congelées, en commençant les dosages le plus rapidement possible après l'extraction ; les enzymes de la glycolyse les plus fragiles (GAPD, PFK, PK, PGK) étant dosés en premier.

Chapitre 4

LE DOSAGE ENZYMATIQUE

Les méthodes de dosage peuvent être classées en trois grandes rubriques :

I - METHODES CHIMIQUES

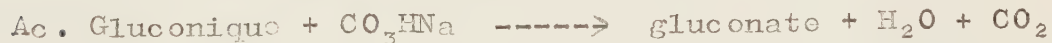
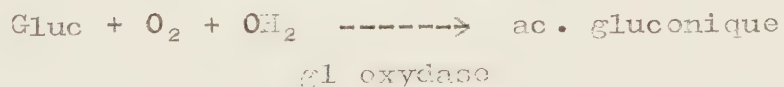
Elles consistent à doser la concentration du produit ou du substrat en fonction du temps.

Ex. Dosage de l'aldolase par colorimétrie.

II - METHODES MANOMETRIQUES

Elles peuvent être employées chaque fois qu'une réaction s'accompagne d'un dégagement de gaz. Il peut s'agir de la transformation enzymatique elle-même, ou d'une réaction couplée. Ainsi, quand le produit de la réaction est un acide, il peut être titré manométriquement par production de CO_2 en présence de bicarbonate.

Ex. Méthode de Keilin et Hartree pour le dosage du glucose.

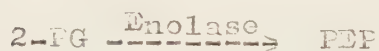


III - METHODES SPECTROPHOTOMETRIQUES

Les plus simples et les plus employées, elles sont applicables chaque fois qu'une réaction enzymatique s'accompagne d'une variation de densité optique liée soit au substrat, soit à un colorant associé, soit à un coenzyme d'oxydo réduction.

a) Variation de densité optique liée au substrat

Ex. : dosage de l'Enolase dans la réaction :

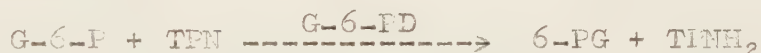


Le PEP absorbant à 240 mμ, permet la mesure de l'activité de l'enolase.

b) Variation de densité optique liée à un colorant

Les colorants peuvent servir d'indicateur dans des réactions couplées.

Ex. : dosage de la G-6-PD par le di Chloro phénol indophénol



La Phenazine methosulfate (PMS) sert de transporteur d'hydrogène entre le TPNH₂ et le di Chloro phénol indophénol. La décoloration de ce dernier est mesurée à 620 mμ.

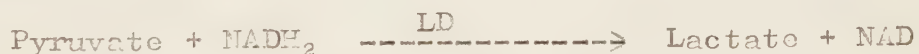
c) Variation de densité optique liée à un coenzyme

1 - Principe général

Tous les enzymes de la voie glycolytique d'Embdon-Meyerhof et les deux déshydrogénases de la voie oxydative directe sont dosés selon le principe proposé par Warburg : la vitesse est appréciée par réduction ou oxydation d'un pyridine nucléotide (NAD^+ ou NADP^+) que l'on mesure par la variation de densité optique au maximum de la bande réduite (340 nm) ou à une longueur d'onde voisine (366 nm).

Deux éventualités sont possibles :

a) L'enzyme dosé est une déshydrogénase à NAD ou NADP : il suffit alors d'ajouter le substrat et le coenzyme en excès pour déclencher la réaction. On dosera, par exemple, la lactico déshydrogénase (LD) en mesurant la vitesse de décroissance à 340 nm (ou à 366 nm) du NADH_2 selon l'équation suivante :



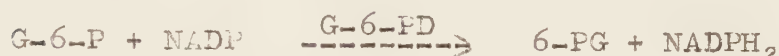
Les différentes déshydrogénases : glucose-6-phosphate déshydrogénase, 6-phospho gluconate déshydrogénase et phospho glycéraldéhyde déshydrogénase seront déterminées selon le même principe.

b) L'enzyme dosé n'est pas une déshydrogénase : les préparations enzymatiques commerciales hautement purifiées ont permis de généraliser la méthode précédente : pour s'y ramener, il suffit en effet qu'apparaisse dans les termes de la réaction

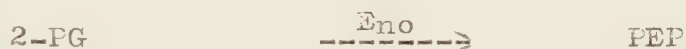
un substrat sensible à l'action d'une déshydrogénase à pyridine nucléotide ; l'addition d'un excès de cette déshydrogénase et du coenzyme pyridinique déclenche la réaction dont la vitesse est mesurée.

Précision sur deux exemples :

- le produit de la réaction mesurée est lui-même transformé par une déshydrogénase : ainsi l'hexokinase est dosée par couplage avec la G-6-PD :



- le produit de la réaction mesuré est à son tour transformé par un enzyme d'appoint en un substrat de déshydrogénase. Par exemple, l'enolase sera dosé en présence d'un excès de pyruvate kinase et de lactico déshydrogénase :



La vitesse de la réaction déshydrogénasique finale mesurera effectivement l'activité de l'enzyme étudié si les conditions suivantes sont réalisées :

- l'enzyme mesuré doit être limitant, donc son activité beaucoup plus faible que celle des enzymes d'appoint ajoutés en grand excès dans la cuve.

- la réaction déshydrogénasique finale doit être faiblement réversible dans les conditions du dosage et sa constante de Michaelis basse vis-à-vis du substrat qui lui est fourni.

Les trois déshydrogénases d'appoint utilisées pour le dosage des enzymes de la glycolyse répondent de façon satisfaisante à ces conditions (tableau 1).

	K_M	$K_{app} = K \times \frac{1}{(H^+)}$
Lactico déshydrogénase (muscle lapin)	Pyr pH 7.4 9.10^{-5} M	$\frac{(Pyr) \cdot (NADH_2)}{(Lact) \cdot (NAD)} = 4,0.10^{-5}$ (pH 7.0)
Glycérophosphate déshydrogénase (muscle lapin)	DHAP pH 7.0 $4,6.10^{-4}$ M	$\frac{(DHAP) \cdot (NADH_2)}{(GP) \cdot (NAD)} = 5,5.10^{-5}$ (pH 7.0)
Glucose-6-phosphate déshydrogénase (levure)	G-6-P pH 8.0 $6,9.10^{-5}$ M	$\frac{(6-PGlactone) \cdot (NADH_2)}{(G-6-P) \cdot (NADP)} = 24$ (pH 7.6) (NB)

Tableau 1 : Constantes de Michaelis (K_M) et constante d'équilibre apparentes (K_{app}) des trois déshydrogénases d'appoint.

(NB) L'hydrolyse de la lactone rend la réaction pratiquement irréversible dans les conditions du dosage.

2 - Les conditions de milieu du dosage enzymatique

La nature et le pH du tampon, la température, la concentration en effecteurs, en substrats et en cosubstrats, tels sont les principaux paramètres physico-chimiques susceptibles de modifier la vitesse d'une réaction enzymatique : aussi importe-t-il de les indiquer avec précision et de les standardiser.

a) Le tampon

Le tampon intervient par sa nature même, par son pH et par sa force ionique. Les tampons cationiques -particulièrement les dérivés aminés- sont considérés comme les moins traumatisants TRIS/HCl ou TEA/HCl. Entre ces deux tampons (pourtant d'une nature proche), le choix n'est pas indifférent : ainsi, la G-6-PD est activée par le Mg^{++} en tampon TRIS, alors qu'en TEA, le Mg^{++} s'avère sans effet, et même inhibiteur en présence de EDTA. De même, le TRIS forme avec le phosphoglycéraldéhyde une base de Schiff., ce qui exclut son emploi pour le dosage de la GAPD.

Le choix du pH du dosage n'est pas entièrement arbitraire : comme il ne peut être question, pour des raisons de commodité, de mesurer chaque enzyme à son pH optimum, la règle est de se maintenir à proximité du pH physiologique (qui-dans le cas des enzymes de la glycolyse- n'est jamais très éloigné du pH optimum).

b) La température

En suivant la même logique, nous devrions doser les enzymes à 37° C. Cela suppose une préincubation prolongée de la cuve de dosage -la plupart des réactifs étant conservés à 0° C. Pour des raisons de commodité, l'unité internationale a donc été définie à 25° C. Les spectrophotomètres sont généralement équipés d'un dispositif thermostaté permettant de maintenir cette température pendant les dosages.

c) La concentration des effecteurs, substrats et cosubstrats :

Condition fondamentale de la mesure enzymatique, la relation de proportionnalité entre quantité d'enzymes et vitesse de la réaction n'est satisfaite que lorsque l'enzyme est saturé par son substrat et ses éventuels cosubstrats. Dans ces conditions, la réaction est d'ordre zéro : elle évolue linéairement avec le temps, et la pente de la droite qui correspond à la vitesse maximum est proportionnelle à la concentration de l'enzyme : elle mesure l'activité enzymatique.

A ces règles théoriques, quelques exceptions doivent être soulignées :

α - Il arrive que, même en présence d'une concentration saturante de substrats, la cinétique ne soit pas d'ordre zéro : ainsi, la phosphoglyceraldéhyde déshydrogénase mesurée en présence de GAP, de NAD^+ et d'arséniate présente une cinétique d'ordre 1 (fragment d'hyperbole équilatère) : dans ce cas,

la vitesse maximum est assimilée à la pente à l'origine de la courbe précédente, (dont la détermination n'est pratiquement possible que sur un enregistrement). De même, la lactico-déshydrogénase mesurée en présence de pyruvate et de NADH_2 affecte une cinétique encore plus complexe, constituée de plusieurs segments de droites de pente décroissante (ce qui a été interprété comme le résultat de l'hétérogénéité de cet enzyme).

β - Certains enzymes sont inhibés par leur propre substrat, et la courbe qui représente la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat s'infléchit aux fortes concentrations. Dans ce cas, la concentration initiale optimum de substrats doit être définie. La lactico-déshydrogénase en est l'exemple classique : du fait de son hétérogénéité, la concentration optimum en substrats varie d'un tissu à l'autre (figure 1).

γ - Enfin, certains enzymes sont inhibés par le produit de la réaction : ainsi, l'hexokinase, par le G-6-P. Mais les conditions de dosage spectrophotométrique lèvent cette difficulté, puisque le G-6-P est repris par la G-6-PD et transformé en 6-PG sans action de l'enzyme.

En conclusion, les caractères physico-chimiques du milieu influencent dans de larges proportions le résultat du dosage enzymatique, ce qui impose une standardisation aussi précise que possible. Les règles que nous avons adoptées sont simples et généralement admises : pH physiologique, température de 25°C , concentration optimum de substrats et de coenzymes.

3 - La mesure spectrophotométrique

Pour mesurer la variation de densité optique provoquée par la réduction du NAD (ou NADP) ou l'oxydation du NADH₂ (ou NADPH₂), deux types de photomètres sont utilisés.

a) Les spectrophotomètres à spectre continu dans lesquels la lumière d'une lampe émettrice est dissociée par un prisme ou par un réseau (dispositif monochromateur).

b) Les photomètres dont la lampe (Hg ou Cd fournit un spectre de raies, un filtre permettant de sélectionner la raie convenable.

Les spectrophotomètres du premier type dosent les pyridine-nucléotides à 340 nm, mais nécessitent des cuves en quartz, ceux du second type exploitent la raie du Hg à 366 nm ce qui permet l'emploi de cuves ordinaires en verre.

La mesure à 366 nm diminue de moitié environ la sensibilité de la mesure (NB). C'est cependant un photomètre à raie filtrée que nous recommandons (photomètre Eppendorf M) pour les raisons suivantes. :

1) La raie Hg 366 nm et le filtre associé assurent un parfait monochromatisme qui ne peut se modifier : par contre, les dispositifs monochromateurs des spectrophotomètres risquent de se dérégler et nécessitent un étalonnage fréquent.

(NB) La sensibilité est diminuée dans le rapport des coefficients d'extinction 340/366 nm, soit 0,530.

(les variations de coefficient d'extinction molaire au voisinage de 340 nm sont toutefois assez faibles).

2) Par ailleurs, le photomètre Eppendorf est muni d'un dispositif de surcharge électrique qui permet de se replacer dans la zone de plus grande sensibilité de lecture (0 à 0.25), en conservant une sensibilité constante, quelle que soit la densité optique initiale des solutions. Or, les extraits tissulaires (globulaire entre autres) absorbent fortement la lumière. Si l'activité enzymatique est faible -donc la prise d'essai importante- les spectrophotomètres classiques deviennent d'un emploi impossible : c'est le cas, par exemple, lors du dosage de l'hexokinase du globule rouge.

Ce photomètre possède en outre un dispositif d'enregistrement à plusieurs gammes de sensibilité. Avec la plus sensible, une déflexion de 1 mm sur le papier correspond à une variation de densité optique de 0,00125 donc à une variation de concentration dans la cuve de dosage de l'ordre de 0,3 μ Moles de pyridine nucléotides réduits par ml. On compense donc ainsi largement la perte de sensibilité de la mesure à 366 nm. Insistons sur un autre avantage des enregistrements automatiques : outre le gain de temps qu'ils représentent, ils fournissent une analyse précise de la cinétique enzymatique lorsque cette dernière n'est pas rigoureusement linéaire ou ne démarre qu'après une période de latence. Par ailleurs, le tracé décèle une anomalie dans la cinétique de la réaction qui serait passée inaperçue dans les mesures par point.

LD 1 0.33.10⁻³ M
LD V 1.25.10⁻³ M

10⁻³ M

Plasma 0.40
Coeur 0.55
Gl.rouge 0.55
Os 0.55
Foie 0.90
Intestin (mugueuse) 1.20



Figure 1 - Influence de la concentration en pyruvate sur l'activité lactico déshydrogénasique.

4 - L'expression des résultats

La vitesse maximum d'une réaction enzymatique mesurée, dans des conditions expérimentales définies, la quantité de protéine enzymatique présente dans le milieu de réaction.

Le résultat du dosage doit donc exprimer en un système d'unités standardisées cette vitesse maximum, et la rapporter à un paramètre tissulaire convenablement choisi (poids, volume, azote total, azote protéique...)

A - Systèmes d'unités enzymatiques

1) l'I.U.B. conseille l'emploi d'une unité internationale : c'est la quantité d'enzyme qui transforme une micromole de substrat par minute à 25° C.

Rappelons que les coefficients d'extinction molaire du DPNH et du TPNH sont les suivantes :

à 340 nm : $6,22 \cdot 10^6$ cm² / Mole

à 366 nm : $3,30 \cdot 10^6$ cm² / Mole

Ceci signifie qu'à 366 nm, par exemple, une "solution" de 1 mole/cm³ produit une extinction de $3,30 \cdot 10^6$ dans une cuve de 1 cm de trajet optique.

1 μMole / ml provoque donc une extinction de 3,30.

Soit $\Delta E_{366} \cdot \text{min}^{-1}$, la variation d'extinction observée par minute à 366 nm : elle correspond à l'oxydation ou la réduction de $3,3 \times \Delta E_{366} \cdot \text{min}^{-1}$ μMoles de NADH ou de NAD par minute par ml de milieu réactionnel, donc à la transformation d'une quantité égale de substrat.

Dans une cuve contenant v ml de mélange réactif, la quantité totale d'enzyme présent sera donc exprimée par :

$$(\Delta E_{366} \cdot \text{min}^{-1}) \times v / 3,30 \text{ unités internationales à } 366 \text{ nm.}$$

$$(\Delta E_{340} \cdot \text{min}^{-1}) \times v / 6,22 \text{ unités internationales à } 340 \text{ nm.}$$

2) Autres systèmes d'unité

Si l'unité internationale est actuellement utilisée de façon systématique, il n'en était pas de même il y a quelques années : dans les publications parues avant 1964, il est fréquent de rencontrer des résultats exprimés différemment.

En ce qui concerne les dosages spectrophotométriques qui nous intéressent seuls, il nous faut donc rappeler l'existence de deux unités enzymatiques plus anciennes :

- l'unité Wroblewski
- l'unité Bucher.

L'unité Wroblewski se définit comme la quantité d'enzyme produisant une ΔE de 0,001 par minute à 340 nm dans une cuve de 1 cm de trajet optique. Il est donc évident que cette unité n'a de signification -et ne peut être transformée en unité internationale- que si le volume total du mélange réactif dans la cuve est connu.

En reprenant les symboles précédents :

$\Delta E_{340} \cdot \text{min}^{-1} \times 1000 = \text{quantité d'enzyme présente dans la cuve en unité Wroblewski.}$

Une unité Bucher est la quantité d'enzyme qui produit une différence d'extinction de 0,100 en 100 secondes à 366 nm et à 25° C, rapportée à 1 ml de mélange réactif dans une cuve de 1 cm de trajet optique.

En utilisant toujours la même notation, la quantité d'enzyme présente dans la cuve contenant v ml de mélange réactif est

$$\Delta \frac{E_{366} \cdot \text{min}^{-1}}{0,100} \times \frac{100}{60} \times v$$

Soit $\Delta E_{366} \cdot \text{min}^{-1} \times 16,7 : v$ unités Bucher.

Le tableau 2 rappelle la définition des trois principales unités enzymatiques et indique le mode de calcul à partir de la $\Delta E \cdot \text{min}^{-1}$ (à 340 nm = ΔE_{340} , ou à 366 nm = ΔE_{366}). La quantité d'enzyme présente dans la cuve est égale à la $\Delta E \cdot \text{min}^{-1}$ observée, multipliée par le facteur inscrit en regard de l'unité désirée (v = volume total des réactifs dans la cuve de 1 cm de trajet optique).

Résultats exprimés en	1 unité correspond à	Mode de calcul	
		$E_{340} \cdot \text{min}^{-1}$	$E_{366} \cdot \text{min}^{-1}$
Unités internationales	1 μ Mole de substrat transformée par minute	$\times \frac{V}{6,22}$	$\times \frac{V}{3,3}$
Unités Wroblewski	une E_{340} de 0,001 par minute	$\times 1000$	
Unités Bucher	une E_{366} de 0,100 en 100 secondes rapportée à 1 ml de réactifs		$\times 16,7 \times V$

Tableau 2 : Les 3 systèmes d'unités enzymatiques.

L'unité internationale définie ci-dessus apparaît
comme la plus logique :

a) Elle est applicable à tous les enzymes, qu'ils soient
dosés spectrophotométriquement ou par tout autre procédé.

b) Elle est indépendante du volume des mélanges
réactifs dans la cuve et de la longueur d'onde de lecture.

Si l'on veut, par exemple, comparer entre elles les
activités des différents enzymes d'une même chaîne métaboli-
que, enzymes dosés les uns par spectrophotométrie, les autres
par d'autres procédés, l'unité internationale est la seule
utilisable.

Cependant, pour faciliter la comparaison avec d'anciens résultats, on peut utiliser des formules de conversion qui permettent de transformer en unités internationales les unités Bucher ou Wroblewski et inversement (cf Bergmeyer 2).

B - Choix de la valeur de référence tissulaire

1°) Principes généraux

Le résultat du dosage enzymatique doit être rapporté à un paramètre tissulaire représentatif :

a) Au poids frais

Donnée brute de signification souvent complexe, car on ne tient pas compte des variations des différents constituants et en particulier de l'eau.

b) Au poids sec

On élimine alors les variations de teneur en eau, sans neutraliser pour autant toutes les autres variables : glycogène, lipides et protéines.

c) Au taux de protéines (dosées par la technique du Biuret ou de Lowry) ou au taux d'azote total (mesurée après destruction sulfurique). Cependant, ces paramètres ne représentent pas obligatoirement l'azote total ou le taux de protéines cellulaires.

d) Au taux d'ADN

Mode de référence le plus stable, car la teneur en ADN est une constante de la cellule somatique. Le taux d'ADN permettant de mesurer le nombre de cellules

dans un organe (cellularité). L'activité enzymatique est mesurée uniquement au niveau cellulaire.

Critique

Le taux d'ADN ne donne pas toujours une représentation exacte du nombre de cellules d'un organe donné, car il existe des cellules plurinuclées (cellules hépatiques par exemple) d'où une erreur par excès. Par contre, dans l'étude d'un homogénat total de rate, par exemple, on commet une erreur par défaut due à la présence de nombreux globules rouges : cellules sans noyau.

Enfin, le taux d'ADN est fonction de l'homogénéisation ; car il varie avec le nombre de noyaux cassés, les noyaux intacts étant éliminés par la centrifugation.

2°) Applications

a) Les enzymes du globule rouge

Ils peuvent être rapportés :

- à un ml de culot globulaire,
- à un gramme de culot globulaire,
- à un nombre déterminé de globules rouges (10^{10} ou 10^{11})
- à la concentration en hémoglobine.

Dans les deux premiers cas, il faut tenir compte du plasma inclus, et donc pratiquer une hématocrite sur le culot globulaire pour effectuer la correction. Lorsque l'on rapporte le résultat à un nombre de globules rouges, on effectue

une numération avant hémolyse. Dans le dernier cas enfin, l'hémoglobine est dosée sur l'hémolysat. Le tableau 3 permet de relier les différentes valeurs de références érythrocytaires chez l'homme normal. Il faut cependant remarquer que dans ces conditions pathologiques, ou les valeurs de référence du tableau s'écartent notablement de la moyenne physiologique normale, il n'est pas indifférent de rapporter les résultats enzymatiques à tel ou tel paramètre globulaire. Nous choisissons généralement le volume globulaire corrigé du plasma inclus : comme le poids, il nous paraît représenter le plus fidèlement la quantité réelle de "matière globulaire" présente dans le milieu de réaction.

Un exemple nous montrera la pratique de calcul dans ce dernier cas : un enzyme est dosé sur 100 μ l d'un hémolysat 1/10ème (volume/volume) dans une cuve contenant 3 ml de réactifs. Nous trouverons une $\Delta E_{366} \cdot \text{min}^{-1} = 0,020$.

La cuve contient donc :

$0,020 \times \frac{3}{3,3}$ U.I. d'enzyme qui correspond à 100 μ l d'hémolysat au 1/10.

Le résultat sera donc :

$0,020 \times \frac{3}{3,3} \times 100 = 1,82$ U.I./ml de globules rouges (valeur non corrigée du plasma inclus).

Si l'hématocrite du culot était de 96 % par exemple, la valeur corrigée sera donc :

$1,82 \times 100 = 1,90$ U.I./ml de globules rouges.

	Sang total ml	GR ml	GR 10°	GR poids frais g	GR poids sec g	GR protéi- nes to- tales g	GR hémoglo- bine g	GR N pro- téique mg
Sang total	1 ml	0,45	0,5	0,5	0,18	0,15	0,15	25
GR	1 ml	1	1,1	1,1	0,40	0,35	0,33	56
GR	10°	0,9	1	1	0,35	0,32	0,30	50
GR poids frais	1 g	0,9	1	1	0,36	0,32	0,30	50
GR poids sec	1 g	2,5	2,8	2,8	1	0,88	0,84	142
GR protéines totales	1 g	2,9	3,2	3,2	1,12	1	0,95	150
GR hémoglobine	1 g	3	3,3	3,3	1,19	1,05	1	168
GR N protéiques	100 mg	1,8	2	2	0,71	0,53	0,50	100

Tableau 3 - Facteurs de transformation dans l'expression des activités.
(globules rouges humains)

b) Les tissus parenchymateux

Les différents paramètres (poids frais, poids sec, N ADN) ne sont pas en rapport constant : les variations physiologiques, les effets du régime et de certains états pathologiques, la durée plus ou moins longue d'homogénéisation entraînent des écarts non négligeables. On est donc réduit à exprimer les activités enzymatiques par rapport à plusieurs paramètres.

Un exemple nous est fourni par la mesure de l'activité des enzymes de la glycolyse de la muqueuse intestinale de rats soumis à un régime alimentaire normal, puis au jeûne. Si le paramètre choisi est le poids frais, les activités dans le jeûne sont nettement diminuées. Par contre, les activités spécifiques sont les memes dans les deux cas, le jeûne ayant entraîné une diminution du taux des protéines.

Exemple du muscle

Les variations physiologiques dues au taux de glycogène par exemple, rendent sans valeur les paramètres poids frais et poids sec. Dans le muscle normal, on peut se rapporter aux taux des protéines : elles ont une origine presque exclusivement cellulaire (seule une petite fraction, moins de 2 % provient des substances de structure : collagène et elastine). Cependant, dans certains cas pathologiques, le taux de collagène et d'élastine est beaucoup plus élevé, mais grace à leur insolubilité dans une solution faible de

soude, il est possible de les séparer. Le taux d'azote restant, appelé N non collagénique (NCN) est une base de référence variable pour le muscle sain et normal. (81) (82)

Exemple de l'os

L'eau et les sels minéraux variant avec le degré de minéralisation de l'os, les activités ne peuvent être rapportées au poids frais ou au poids sec. On a donc ramené les activités à l'azote total. Cependant, ce paramètre n'est pas très exact, car il est la somme de l'azote du collagène, des MPS et des protéines cellulaires. L'azote non collagénique n'élimine pas non plus l'azote apporté par les MPS ; il est donc préférable de se rapporter au taux d'ADN. (NB)

(NB) MPS = Mucopolysaccharides.

Chapitre 5

LES TECHNIQUES DE DOSAGE

A - LES REACTIFS : Tableau 1

Nous avons pu vérifier sur les nombreux lots de substrats et de coenzymes utilisés depuis trois ans, que leur pureté est satisfaisante. Cependant, dans certains cas, nous contrôlons la concentration des solutions par les méthodes spectrophotométriques ou enzymatiques classiques. Certains substrats sont contaminés par des traces de produits interférant dans le dosage : par exemple, le fructose-6-phosphate par du glucose-6-phosphate. Ces faibles concentrations de substrats parasites (signalées dans les techniques) sont d'abord éliminés avant de déclencher les réactions et l'emploi d'un photomètre enregistreur est dans ce cas très utile pour suivre l'épuisement (d'ailleurs très rapide) de substrat contaminant.

La pureté des enzymes Boehringer est satisfaisante (NB).

Les solutions de substrats et de coenzymes sont conservées à l'état congelé (à - 20° C), fractionnées en tubes à hémolyse bouchés. Les enzymes sont stockés dans un conservateur à + 2° C. Dans ces conditions, les échantillons se

(NB) Nous n'entrerons pas dans la discussion des causes d'erreurs que peuvent introduire des activités parasites (cf Bergmeyer) : elles sont aisément contrôlables, et nous n'avons jamais constaté d'activités suffisamment importantes pour fausser le dosage.

Réactifs	Réactif n°	Origine	PM	Concentrations		NB
				µM	mg/ml	
1 - MILIEU ET EFFECTEURS						
Tampon pH 7,6 TEA base EDTA _{Na2H2}	1		149,2 372,3	100 10	14,92 3,72	a
KCl	2		74,55	750	55,91	
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	3		203,3	600	121,98	
Arséniate : Na ₂ HAsO ₄ , 7 H ₂ O	4		312	210	65,52	b
2 - SUBSTRATS						
Glucose	5 A 5 B		180,2	600 3	108,1 0,54	c
Glucose-1-P : G-1-P _{K2}	6	N	372,4	52,5	19,55	
Glucose-6-P : G-6-P _{Na2}	7	B	304,1	52,5	15,96	
6-P _{Na} ° gluconate : 6-PG-Ba	8	B	479,2	52,5	25,15	d
Fructose-6-P : F-6-P-Ba	9	B	395,5	52,5	20,76	d
Fructose-1,6-diP : FDP _{-Na3H}	10	B	406,1	52,5	21,32	
DL-Glycéraldéhyde-3-P, diéthyl- acétal (sel de Baryum)	11	B	379,5	DL = 42 (D = 21)	15,94	e

Réactifs	Réactif n°	Origine	IM	Concentrations		NB
				mM	mg/ml	
3-Ph ^o -Glycérate : 3-PG-Ba, 2H ₂ O	12	B	357,4	52,5	18,76	d
2-Ph ^o -Glycérate : 2-PG-Ba	13	B	321,4	52,5	16,87	d
2,3-di Ph ^o -Glycérate : 2,3-DPG (dicyclohexylammonium)	14	B	833,9	1	0,834	
3 ^o -Enol-Pyruvate (sel de tricyclohexyl-ammonium)	15	B	455,6	52,5	24,44	
Pyruvate : Pyr-Na	16		110	52,5	5,77	
3 - <u>COENZYMES</u>						
Adénosine-triphosphate : ATP-Na ₂ , 3 H ₂ O	17	F	605,2	52,5	31,77	f
Adénosine-di-phosphate : ADP - Na ₂	18	P	493,2	52,5	25,89	s
Nicotinamido-adénine-dinucléoti- de NAD (acide libre)	19	P	700	15	10,5	n
Nicotinamido-adénine-dinucléoti- de phosphate NADP-Na	20	P	765	15	11,47	n
Nicotinamido-adénine-dinucléoti- de réduit NADH ₂ -Na ₂	21		709	15	10,63	s, 1

	Nomenclature I.U.B.	Réactif n°	n° Boehr- lin- Ger	Activité (en U.I.)	
				par mg d'enzyme	par ml de suspension
4 - <u>ENZYMES</u>					
Aldolase	4-1-2-13	22	15419	9	90
Enolase	4-2-1-11	23	15327	27	270
Glucose-6-phosphate déshydrogénase	1-1-1-49	24	15303	140	140
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	1-2-1-12	25	15145	36	360
Glycérophosphate déshydrogénase	1-1-1-8	25	15135	36	360
Lactico déshydrogénase	1-1-1-27	27	15145	360	3600
Phosphoglycérate kinase	2-7-2-3	28	15745	180	1800
Phosphotriose isomérase	5-3-1-1	29	16333	2400	4800
Pyruvate kinase	2-7-1-40	30	15744	125	1250

Tableau 1 - Réactifs

ORIGINE : N Nutritional Biochemicals Corporation.

P Pabst

- a) TEA, base (redistillée sous vide) - Ajuster le tampon à pH 7,60 avec HCl N.
- b) Ajuster le pH à 7,60.
- c) Le G-1-P Boehringer (utilisé pour le dosage de la phosphohexomutase) renferme des traces de G-1,6-DP, nécessaires et suffisantes comme coenzyme de la mutase. Le G-1-P très purifié est inactif : dans ce cas, il est nécessaire d'introduire des traces de G-1,6-DP (dans la technique n° 9 : 200 μ l d'une solution 100 μ M, soit une concentration finale de $6 \cdot 10^{-6}$ M).
- d) Sel de Baryum : dissoudre à 0° C par addition de HCl dilué, précipiter Ba par Na_2SO_4 20 %. Centrifuger, neutraliser par NaOH et compléter au volume.
- e) GA-3-P Boehringer : dissoudre en acidifiant légèrement (HCl). Chauffer trois minutes à 100° C avec Dowex 50 H^+ . Refroidir à 0° C. Centrifuger. Neutraliser le surnageant avec NaOH (ne pas dépasser pH 6 environ). Compléter au volume.
- f) Amener à pH 8 environ avec NaHCO_3 .
- g) Dissoudre dans NaHCO_3 1 %.
- h) Ajuster à pH 6 environ avec NaHCO_3 .
- i) La solution ne doit pas être conservée plus de deux jours.

conservent pendant au moins un mois.

B - TECHNIQUES

Pendant la durée des dosages, l'extrait, les enzymes et substrats sont maintenus dans un bain de glace.

Dans ces dosages en série, ou la rapidité d'exécution constitue un facteur primordial, nous utilisons des pipettes automatiques Eppendorf, qui simplifient considérablement les manipulations sans nuire à la précision des prélèvements. Seule, la prise d'essai de l'extrait est effectuée avec des micropipettes à constriction de verre (Pleuger).

Pour certaines activités très élevées (comme la PTI, la LD ou la PGK) pour éviter de mesurer de trop faibles volumes, nous diluons extemporanément l'extrait avec le tampon d'extraction additionné de serum albumine de boeuf (0,5 ml d'une solution à 0,1 pour cent pour 5 ml de tampon).

L'ordre de présentation des techniques correspond à l'ordre chronologique des dosages qui tient compte de la plus ou moins grande labilité des enzymes après leur extraction.

Les réactifs sont indiqués dans leur ordre de prélèvement dans la cuve et le début de la réaction est déclenché par l'addition du dernier réactif. Il est nécessaire de bien agiter le milieu avant et après cette addition : pour éviter de

razer les cuves de mesure, nous utilisons des agitateurs taillés dans une baguette de plexiglas de 4 mm de diamètre.

Dans chaque problème particulier, pour les dosages ou interviennent comme indicateur une réduction de NAD ou une oxydation du NADH_2 , il faut s'assurer que l'extrait ne renferme pas d'activités NADH_2 oxydasique. Cette activité est nulle dans le foie et le globule rouge, mais très élevée dans d'autres tissus (rein par exemple) : dans ce cas, la centrifugation à grande vitesse élimine la NADH_2 oxydase.

Une incertitude dans l'expression des résultats concerne d'une part, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, et d'autre part, les deux enzymes de faible activité ou la G-6-PD est ajoutée au cours du dosage comme enzyme accessoire (hexokinase et phosphohexomutase). En effet, le glucose-6-phosphate formé est oxydé par l'activité 6-phosphogluconate déshydrogénasique de l'extrait et une seconde molécule de NADP est réduite. Le calcul des activités précédentes devrait donc faire intervenir la réduction de deux molécules de NADP.

Le coefficient de réduction est toutefois inférieur à cette valeur de 2 : la plupart des auteurs et nous-mêmes obtenaient expérimentalement des valeurs proches de 1,5 et dans l'expression de nos résultats, nous ne tenons pas compte -arbitrairement- de ce facteur de correction.

Dans les techniques que nous proposons, le volume final du dosage est ajusté à 3 ml. Les concentrations finales des enzymes accessoires (chiffres entre parenthèses) sont indiquées en U.I. pour la totalité des 3 ml de réactifs dans la cuve et ces volumes sont exprimés en μ l.

Pour les prises d'essai tissulaires, la concentration approximative de l'extrait est indiquée

- pour le globule rouge (GR) en vol/vol.
- pour les tissus parenchymateux en grammes pour 100 ml d'extrait.

Dans les cas où le prélèvement tissulaire est faible (ponction biopsique, par exemple), la sensibilité peut être augmentée en réduisant le volume de tous les réactifs au 1/10ème (volume final = 300 μ l) et en effectuant les mesures en microcuve de trajet optique de 10 mm.

Pour terminer, nous donnons les techniques de mesure de la glycolyse globale dans le globule rouge et de la quantité de glucose empruntant la voie des pentoses.

IUE. 1-2-1-12

Réf. (83)

1 - GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DESHYDROGENASE (GAPD)

Volume total = 3000

PRINCIPE



DOSAGE

	N°	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA/EDTA	(1)	100/10	1500	50/5
Arséniate	(4)	210	200	14
NAD	(19)	15	100	0,5
Enzyme + Eau			1000	
D-Glycéraldéhyde-3-P	(11)	21	200	1,4

OBSERVATIONS

- Voir technique 1 bis
- La cinétique obtenue est d'ordre 1 (fragment d'hyperbole) : il faut prendre la tangente à l'origine.

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

GR

Hémolysat 1/10

100

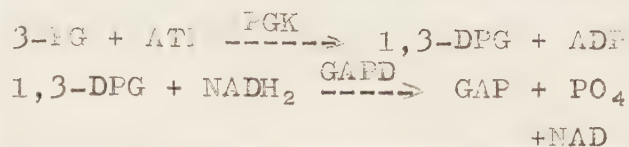
IUB. 1-2-1-12

Réf. (84)

1 bis - GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DESHYDROGENASE (GAPD)

Volume total = 3000

PRINCIPE



DOSAGE

	N°	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Campon TEA/EDTA	(1)	100/10	1500	50/5
MgCl ₂	(3)	600	50	10
NADH ₂	(21)	15	50	0,25
3-PG	(12)	52,5	200	3,5
Phosphoglycérate-kinase	(28)	1800 UI/ml	5	(9 UI)
Enzyme + Eau			995	
ATP	(17)	52,5	200	3,5

OBSERVATIONS

Nous utilisons la technique 1 dans le globule rouge, la technique 1 bis dans le foie et les autres tissus.

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

Foie	2 %	50
Rein	0,2 %	200

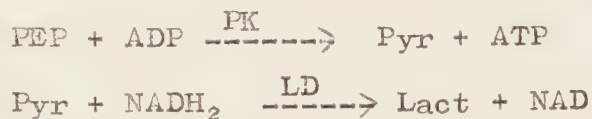
IUB. 2-7-1-40

Réf. (85)

2 - PYRUVATE KINASE (PK)

Volume total = 3000

PRINCIPE



DOSAGE

	N°	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA/EDTA	(1)	100/10	1500	50/5
KCl	(2)	750	200	50
MgCl ₂	(3)	600	50	10
NADH ₂	(21)	15	50	0,25
Ph°-Enol-pyruvate	(15)	52,5	200	3,5
Lactico Dase	(27)	3600 UI/ml	5	(18 UI)
ATTENDRE LA STABILISATION DE L'EXTINCTION (NB)				
Enzyme + Eau			800	
ADP	(18)	52,5	200	3,5

OBSERVATIONS

(NB) Le phospho-enol-pyruvate peut contenir des traces de pyruvate.

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

GR	Hémolysat 1/10	100
Foie	2 %	50
Rein	2 %	50

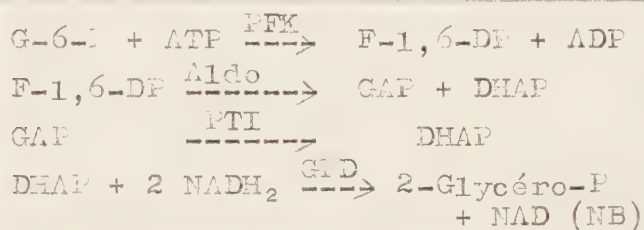
IUB. 2-7-1-11

Réf. (86)

3 - PHOSPHOFRUCTOKINASE (PFK)

Volume total = 3000

PRINCIPLE



DOSAGE

	N°	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA/EDTA	(1)	100/10	1500	50/5
MgCl ₂	(3)	600	50	10
ATP	(17)	52,5	200	3,5
NADH ₂	(21)	15	50	0,25
Ph° Triose isomérase	(29)	4800 UI/ml	5	(24 UI)
Aldolase	(22)	90 UI/ml	10	(0,9 UI)
Glycero-P-Déshydrogénéase	(26)	360 UI/ml	10	(3,6 UI)
Enzyme + Eau			970	
Fructose-6-P	(9)	52,5	200	3,5

OBSERVATIONS

(NB) Il faut donc diviser la $\Delta E \cdot \text{min}^{-1}$ observée par 2 pour effectuer le calcul de l'activité enzymatique.

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

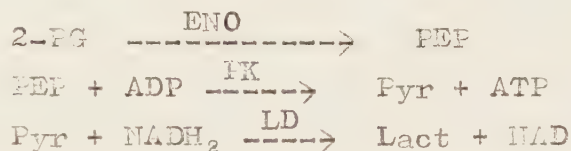
GR	Hémolysat 1/10	100
Foie	2 %	20
Rein	2 %	200

IUB. 4-2-1-11

Réf. (87) (60)

4 - ENOLASE (ENO)

PRINCIPE



DOSAGE

	No	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA/EDTA	(1)	100/10	1500	50/5
KCl	(2)	750	200	50
MgCl ₂	(3)	600	50	10
ADP	(17)	52,5	200	3,5
NADH ₂	(21)	15	50	0,25
Lactico déshydrogénase	(27)	3600 UI/ml	5	(18 UI)
Pyruvate kinase	(30)	1250 UI/ml	5	(6,2 UI)
Enzyme + Eau			780	
2-Ph ^o -Glycérate	(13)	52,5	200	3,5

OBSERVATIONS

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE .

GR	Hémolysat 1/10	100
Foie	2 %	50
Rein	2 %	50

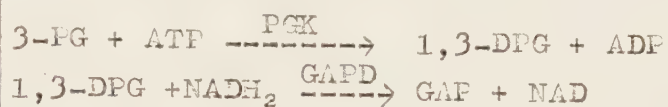
IUB. 2-7-2-3

Réf. (88)

5 - PHOSPHOGLYCERATEKINASE (PGK)

Volume total = 3000

PRINCIPE



DOSAGE

	N°	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA/EDTA	(1)	100/10	1500	50/5
MgCl ₂	(3)	600	50	10
NADH ₂	(21)	15	50	0,25
Mercaptoéthanol	(12)	Pur	5	30
3-phosphoglycérate		52,5	200	3,5
Glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase	(25)	360 UI/ml	10	(3,6 UI)
Enzyme + Eau			980	
ATP	(17)	52,5	200	3,5

OBSERVATIONS

Le mercaptoéthanol est destiné à protéger la glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase.

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

GR	Hémolysat 1/10	10
Foie	2 %	20
Rein	2 %	50

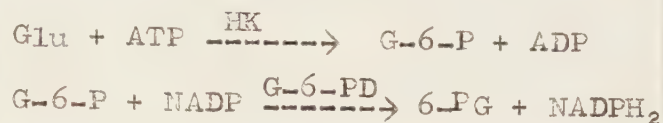
IUB. 2-7-1-1

Réf. (86) (89

6 - HEXOKINASE - GLUCOKINASE (HK - GK)

Volume total = 3000

PRINCIPE



DOSAGE

	N°	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA/EDTA	(1)	100/10	1500	50/5
MgCl ₂	(3)	600	50	10
NADP	(20)	15	100	0,5
Glucose-6-P Dase	(24)	140 UI/ml	5	(0,7 UI)
Glucose cuve A	(5 A)	600	500	100
cuve B	(5 B)	3	500	0,5
Extrait + Eau			645	
ATP	(17)	52,5	200	3,5

OBSERVATIONS

Hexokinase seule : $\Delta E \cdot \text{min}^{-1}$ dans la cuve B
 $\Delta E \cdot \text{min}^{-1}$ dans la cuve A
- $\Delta E \cdot \text{min}^{-1}$ dans la cuve B

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

GR (HK seule : cuve B) Hémolysat 1/10 200
Foie 20 % (cuve A et B) 50
Rein 20 % 50

IUB. 1-1-1-49

Réf. (90)

7 - GLUCOSE-6-PHOSPHATE-DESHYDROGENASE (G-6-PD)

Volume total = 3000

PRINCIPE



DOSAGE

	N°	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA/EDTA	(1)	100/10	1500	50/5
NADP	(20)	15	100	0,5
Enzyme + Eau			1200	
Glucose-6-P	(7)	52,5	200	3,5

OBSERVATIONS

En tampon TEA, le chlorure de magnésium n'est pas nécessaire.

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

GR	Hémolysat 1/10	200
Poic	20 %	50
Roin	20 %	50

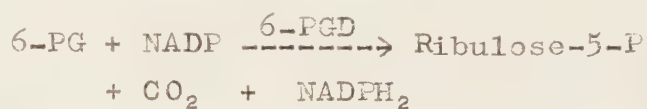
IUB. 1-1-1-44

Réf. (91)

8 - 6-PHOSPHO-GLUCONATE-DESHYDROGENASE (6-PGD)

Volume total = 3000

PRINCIPE



DOSAGE

N°	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
(1)	100/10	1500	50/5
(20)	15	100	0,5
		1200	
(8)	52,5	200	3,5

Tampon TEA/EDTA
NADP
Enzyme + Eau
6-Ph° Gluconate

OBSERVATIONS

En tampon TEA, le MgCl_2 n'est pas nécessaire.

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

GR	Hémolysat 1/10	200
Foie	20 %	50
Rein	20 %	50

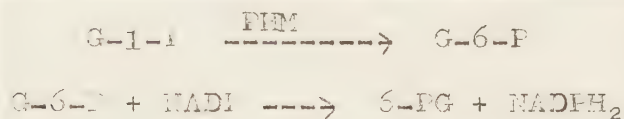
IUB. 2-7-5-1

Réf. (92)

9 - PHOSPHOGLUCOMUTASE (PHM)

Volume total = 3000

PRINCIPE



DOSAGE

	N°	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA/EDTA	(1)	100/10	1500	50/5
MgCl ₂	(3)	500	70	14
NADP	(20)	15	100	0,5
Glucose-6-P Dase	(24)	140 UI/ml	10	(1,4 UI)
Enzyme + Eau			1120	
Glucose-1-P	(6)	52,5	200	3,5

OBSERVATIONS

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

GR	Hémolysat 1/10	200
Foie	2 %	100
Rein	20 %	50

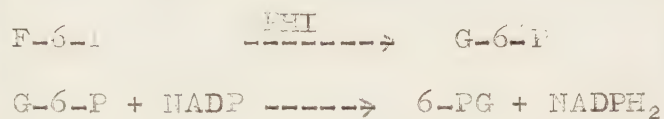
IUB. 5-3-1-9

Réf. (93)

10 - PHOSPHOHEXO-ISOMERASE (PHI)

Volume total = 3000

PRINCIPES



DOSAGE

	N°	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA/EDTA	(1)	100/10	1500	50/5
MgCl ₂	(3)	600	50	10
NADP	(20)	15	100	0,5
Fructose-6-P	(9)	52,5	200	3,5
Glucose-6-P Dase	(24)	140 UI/ml	10	(1,4 UI)
Enzyme + Eau			1140	

ATTENDRE LA STABILISATION DE L'EXTINCTION (NB)

OBSERVATIONS

(NB) Le fructose-6-P est contaminé d'un peu de glucose-6-P qu'il faut préalablement épuiser.

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

GR	Hémolysats 1/10	50
Foie	2 %	50
Rein	2 %	50

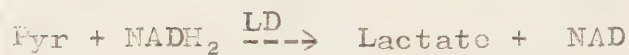
IUB. 1-1-1-27

Réf. (94)

11 - LACTICO-DESHYDROGENASE (LD)

Volume total = 3000

PRINCIPE



DOSAGE

N°	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA/EDTA	(1)	100/10	1500
NADH ₂	(21)	15	50
Enzyme + Eau		20	
Pyruvate	(16)	52,5	n.s.p. 3000 (volume final)
	Plasma	20	0,35
	Coeur		
	GR	40	0,70
	Os		
	Foie	50	0,88
	Muqueuse intestinale	70	1,22

OBSERVATIONS

Un excès de pyruvate inhibe l'enzyme de façon variable suivant les tissus.

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

GR	Hémolysat 1/10	20
Foie	0,2 %	20

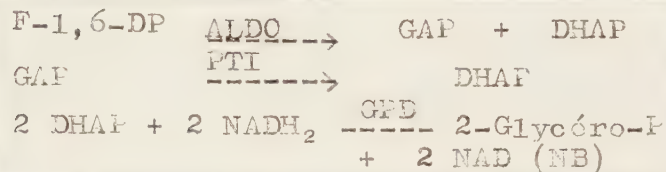
IUB. 4-1-2-13

Réf. (95)

12 - ALDOLASE (ALDO)

Volume total = 3000

PRINCIPE



DOSAGE

	No	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
TEA/EDTA	(1)	100/10	1500	50/5
NADH ₂	(21)	15	50	0,25
Glycéro-P Dase	(26)	360 UI/ml	10	(3,6 UI)
Ph° Triose isomérase	(29)	4800 UI/ml	5	(24 UI)
Enzyme + Eau			1230	
F-1,6-DP	(10)	52,5	200	3,5

OBSERVATIONS

(NB) Il faut donc diviser la $\Delta E \cdot \text{min}^{-1}$ observée par 2 pour effectuer le calcul de l'activité enzymatique.

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

GR	Hémolysat 1/10	200
Foie	2 %	100
Roin	2 %	200

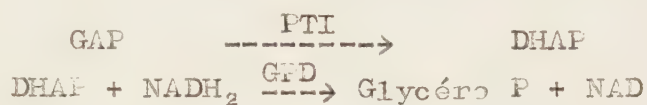
IUB. 5-3-1-1

Réf.(96)

13 - PHOSPHOTRIOSE-ISOMERASE (PTI)

Volume total = 3000

PRINCIPE



DOSAGE

	N°	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA/EDTA	(1)	100/10	1500	50/5
NADH ₂	(21)	15	50	0,25
D-Glycéraldéhyde-3 P	(11)	21	200	1,4
Glycero-P Dase	(26)	360 UI/ml	10	(3,6 UI)
Enzyme + Eau			1240	

OBSERVATIONS

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

GR	Hémolysat 1/10	5
Foie	0,2 %	20
Rein	0,2 %	20

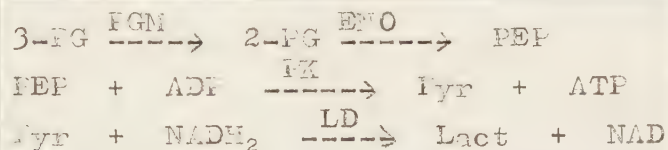
IUB. 2-7-5-3

Réf. (87) (60)

14 - PHOSPHOGLYCERATE - MUTASE (PGM)

Volume total = 3000

PRINCIPE



DOSAGE

	n°	Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA/EDTA	(1)	100/10	1500	50/5
KCl	(2)	750	200	50
MgCl ₂	(3)	600	50	10
ADP	(18)	52,5	200	3,5
NADH ₂	(21)	15	50	0,25
2,3-DPG	(14)	1	200	0,066
Lactico Dase	(27)	3600 UI/ml	5	(18 UI)
Pyruvate kinase	(30)	1250 UI/ml	5	(6,2 UI)
Enolase	(23)	270 UI/ml	10	(2,7 UI)
Enzyme + Eau			580	
3-Ph°-Glycérate	(12)	52,5	200	3,5

OBSERVATIONS

PRISE D'ESSAI TISSULAIRE

F GR	Hémolysat 1/10	50
Foie	0,2 %	200
Rein	2 %	50

15 - GLYCOLYSE GLOBALE

I - Sur globule rouge entier

1) Ajouter à 1 ml de culot globulaire :

Tampon Krebs isotonique (NB) pH 7,4 ----> 0,9 ml

2) Equilibrer à 37° : 15 minutes.

3) Ajouter

Glucose 0.1 M dans tampon Krebs isotonique (NB)

-----> 0,1 ml

4) Incubation à 37° - Agitation constante ----> 3 heures

5) Défécation sur 0,5 ml avec

PCA 0.8 M -----> 0,5 ml

6) Centrifuger et doser le glucose et le lactate
sur le surnageant.

II - Sur hémolysat

1) Ajouter à 1 ml d'hémolysat, 0,9 ml de tampon Krebs
isotonique contenant :

	Concentrations finales
ATP	10^{-3} M
NAD	$3 \cdot 10^{-4}$ M
MgCl ₂	$1,5 \cdot 10^{-3}$ M

2) Equilibrer à 37° : 15 minutes.

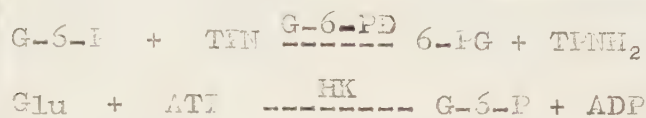
etc...

(NB) Tampon Krebs isotonique

NaCl	0.115 M	PC ₄ HNa ₂ , 2 H ₂ O	0.04 M
KCl	0.004 M	PO ₄ H ₂ Na, H ₂ O	0.04 M
MgCl ₂	0.005 M	Ajuster à pH 7,4.	

DOSAGE DE GLUCOSE

PRINCIPE



DOSAGE

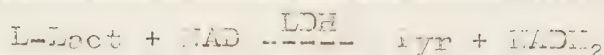
	No	Concentration réactifs (mM)	Volume dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon TEA/EDTA pH 7,6		500/50	300	50/5
MgCl ₂	(3)	500	50	10
ATP	(17)	52,5	200	3,5
TiN	(20)	15	100	0,5
Extrait + Eau			2300	
ETABLIR LA LIGNE DE BASE				
1) G-6-PD	(24)	1 mg/ml	10	1,4 UI
ATTENDRE LA STABILISATION DE LA DO.(NB)				
2) HK		2 mg/ml	10	2,3 UI

OBSERVATIONS

(NB) S'il existe du G-6-P dans l'échantillon.

ACIDE LACTIQUE

PRINCIPE



DOSAGE

		Concentration réactifs (mM)	VOLUME dans la cuve	Concentration finale (mM)
Tampon pH 9,5	Glycocolle	1000		840
	Chlorhydrate de semi- carbazide	200	1400	170
	EDTA- Na_2H_2	5.4		4.5
Extrait + Eau			200	
NAD		70	50	2.1
LDH		3600 UI/ml	10	(36 UI)

OBSERVATIONS

L'équilibre de la réaction est en faveur de la réduction du pyruvate.
Pour obtenir l'oxydation quantitative du lactate :

- on utilise des concentrations élevées de NAD et de LDH
- on piège les ions pyruvate par la semi carbazide
et les ions H^+ par un milieu alcalin pH 9,5.

Dans ces conditions, le dosage du lactate est possible avec la
LDH commerciale (muscle.)

Il est toutefois indispensable de suivre la cinétique par enregistre-
ment, car

- la réaction est très lente
- le NADH_2 se réoxyde spontanément et la correction corres-
pondante n'est possible qu'en extrapolant la courbe.
- le maximum, qui correspond à l'oxydation complète
du lactate présente une position variable selon la concentration.

- Si nous choisissons de mesurer la différence de densité optique à un moment où l'oxydation du lactate est terminée, le point de la courbe ainsi retenu, sera diminué d'une valeur (correspondant à la réoxydation du NADH_2) d'autant plus élevée qu'il se situera plus loin du maximum, et que la concentration en lactate sera plus grande.

- Pour accélérer la réaction, Hohorst (102) la réalise à 37° et mesure à 25° la différence de densité optique : ce qui oblige à une correction (due à la variation de volume et la variation de densité optique du NADH_2 à 366 nm). Pour éviter ces corrections, nous réalisons la réaction et la mesure à la même température (25°C).

EXPLORATION DE LA VOIE DES PENTOSE PAR LE

GLUCOSE 1-¹⁴C

1) Incuber à 37° pendant 15 minutes, une fiole de Warburg contenant :

- dans le puits central : NaOH N → 0,2 ml

- dans l'ampoule latérale : SO_4H_2 2 N → 0,2 ml

- dans la cavité principale :

Culot globulaire → 1 ml

Tampon Krebs isotonique, pH 7,4 → 0,9 ml

2) Après avoir ajouté dans la cavité principale :

- glucose 0,1 M dans tampon Krebs isotonique 0,1 ml

- glucose 1-¹⁴C environ 0,2 microcuries.

Incuber à 37° - Agitation constante pendant 3 heures.

3) Pour interrompre la réaction, l'acide sulfurique de l'ampoule latérale est versé dans la cavité principale.

4) Pour permettre l'élimination du CO_2 et sa fixation par la soude, laisser reposer 1 heure.

5) La cavité principale est vidée, rincée avec 3 ml d'eau bidistillée et le tout est transféré dans un tube à centrifuger.

6) Dans le tube à centrifuger : ajouter :

- CO_3Na_2 0,5 % → 1 ml

- ClNH_4 5 % → 0,2 ml

- Cl_2Ba 10 % → 0,2 ml

- 7) Centrifuger, laver le précipité avec de l'eau bidistillée et deux fois par l'alcool à 100 %.
- 8) Après filtration de la dernière suspension, la radioactivité du précipité est comptée dans un appareil Tracerlab en flux continu.

CALCUL

- Connaissant
- la quantité initiale de glucose
 - la consommation du glucose
 - la quantité de glucose $1^{14}C$ introduite,

on peut déterminer :

- le nombre de coups par minute de glucose total consommé

$$\frac{C.m. (totaux) \cdot (\text{glucose consommé})}{(\text{glucose initial})}$$

- le pourcentage de glucose empruntant la voie des pentoses

$$\frac{C.m. (1^{14}C_{glc}) \cdot 100}{C.m. (\text{glucose total consommé})}$$

Chapitre 6

RÉSULTATS

Nous donnons les spectres glycolytiques du globule rouge humain, du rein et du foie de rat (tableau 2, 3 et 4).

Le tableau 5 rassemble les spectres glycolytiques de différents tissus de rat, les activités étant comparées à celles de la lactico déshydrogénase (= 100).

Le tableau 1 précise l'activité de la lactico déshydrogénase, rapportée à 1 mg d'azote extractible ou à un gramme de tissu : ce qui permet de recalculer les valeurs des tableaux précédents et de les exprimer par rapport à ces deux paramètres (azote extractible, poids frais).

Tableau 1 - Activité de la LDE

	Activité en U.I.	
	Par mg azote de l'extrait	Par g de poids frais
Foie	36,8	559
Muscle	-	222
Muqueuse intes- tinale	18	162
Os	3,4	2 à 15 (selon degré de minéralisation)
Rein	11,5	142

(Moyenne de 40 échantillons)	Activité	
	m =	$\pm$ s
PHN	0,295	0,072
PK	0,143	0,032
PHI	5,95	1,10
PFK	0,802	0,20
Aldo	0,377	0,063
PTI	257,7	44,5
GA D	11,4	1,9
PGK	25,7	4,9
PGI	4,55	0,89
Eno	1,45	0,28
PK	2,43	0,45
LD	16,8	3,0
G-6-PD	1,27	0,20
6-PGD	0,54	0,10

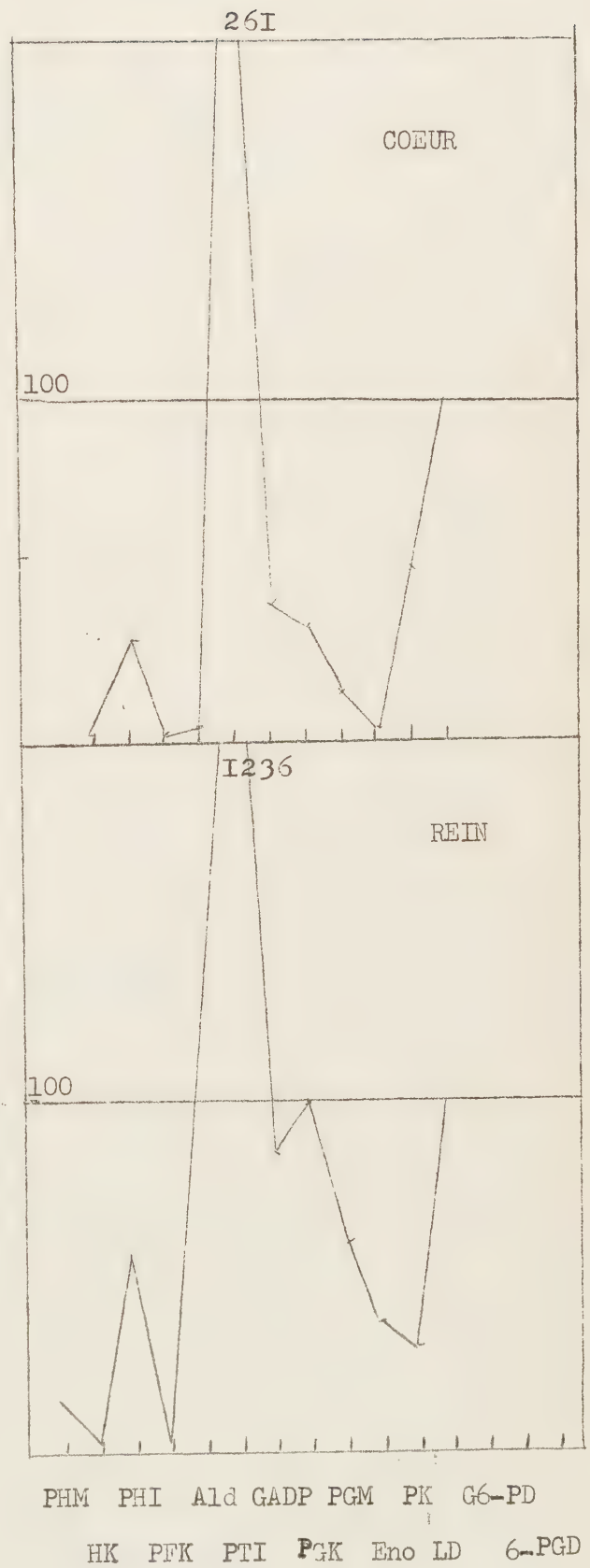
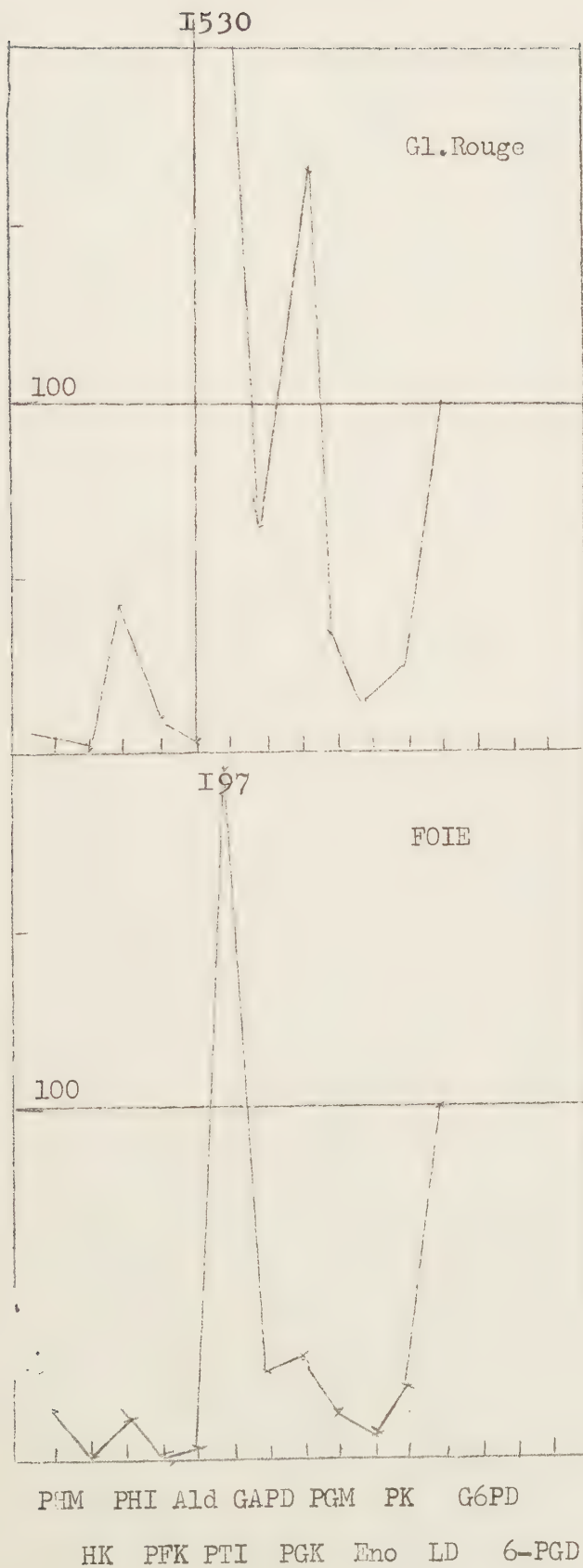
Tableau 2 - Activités des enzymes glycolytiques du
globule rouge humain (en UI par ml GR)

Rein de rat (7)	ACTIVITE				
	Par mg (Azote de 1' extrait		Par g de poids frais		Comparée à LDE = 100
	Moyenne	± S	Moyenne	± S	
PHM	1.8	0.4	22	4.17	15.5
HK	0.16	0.056	1.95	0.75	1.37
PHI	6.3	0.74	79.1	12.9	55.7
PFK	0.28	0.05	3.41	1.37	2.4
Aldo	0.56	0.073	7	1.29	4.9
PTI	140.4	16.3	1757	317	1236
GALD	9.6	0.72	119	14.4	83.8
IGK	11.4	1.7	141	15.2	99
IGM	6.8	1.4	84	16.4	59.2
Eno	4.4	1.3	53.2	13.1	37.5
PK	3.7	0.52	46	7	32.4
LDH	11.5	1.9	142	13.3	100
G-6-PD	0.15	0.025	1.92	0.3	1.35
6-PGD	0.09	0.02	1.12	0.25	0.8

Tableau 3

Foie de rat (8)	ACTIVITE				
	Par mg d'azote de l'extrait		Par g de poids frais		Comparée à LDH = 100
	Moyenne	± S	Moyenne	± S	
PHM	5.2	0.8	81	10.9	14.5
HK	0.035	0.007	0.49	0.05	0.087
PHI	3.4	0.2	61	8.36	11
PFK	0.12	0.014	1.87	0.17	0.33
Aldo	6	0.51	9.20	0.59	1.64
PTI	71.2	27.8	1101	402	197
GAPD	8.7	0.53	136	11	24.3
PGK	9.8	0.45	151	8.8	27
PGM	4.8	0.39	73	6.3	13
Eno	2.6	0.36	40	4	7.15
PK	7.3	1.17	112	17.2	20
LDH	36.8	3.34	559	43	100
G-6-PD	0.232	0.049	360	0.55	0.64
6-PGD	0.161	0.03	2.5	0.4	0.44
GK	0.285	0.07	4.4	0.75	0.78

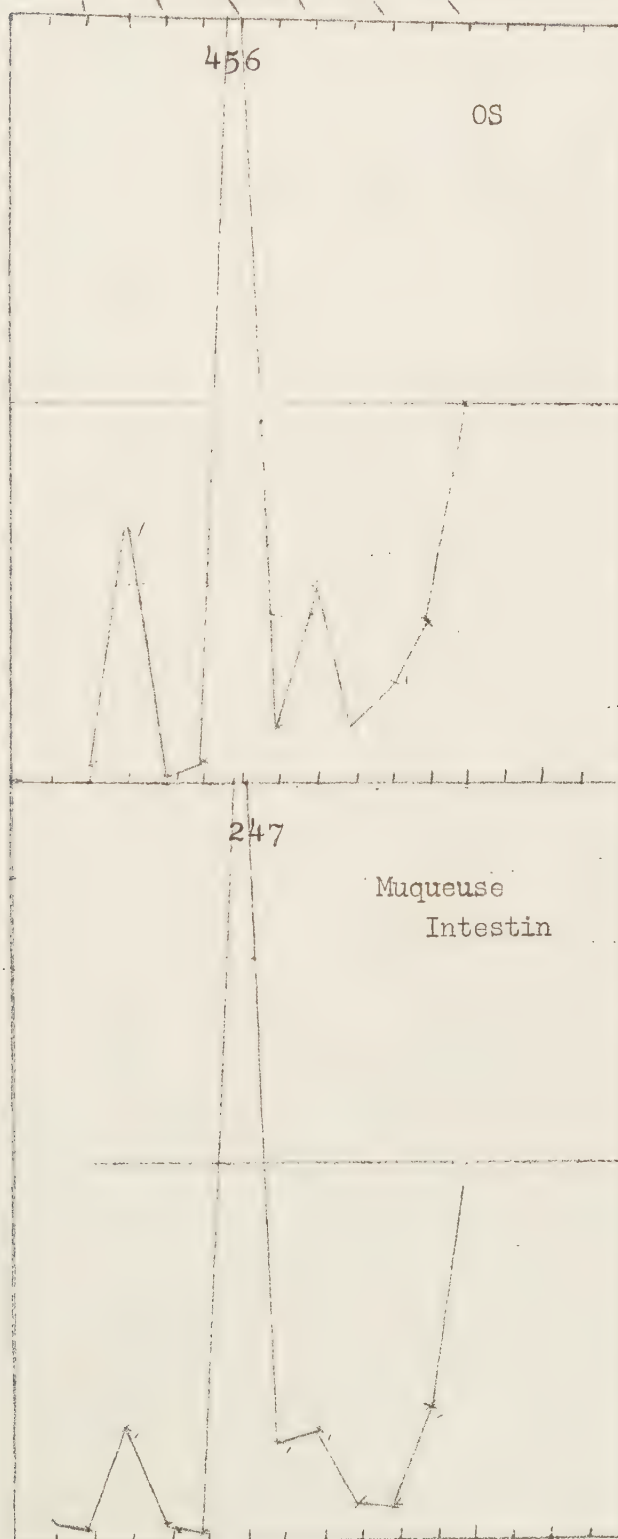
Tableau 4



(Tableau 5)

PHM PHI Ald GAPD PGM PK G6PD

HK PFK PTI PGK Eno LD 6-PGD



CRITIQUE DES RESULTATS

La précision d'un dosage est définie par l'écart standard elle doit être envisagée sous deux aspects :

- le dosage est effectué par le même opérateur et le même appareillage ("Repeatability")
- le dosage est effectué par différents laboratoires ("Reproductibility").

Ainsi, l'écart type dans la mesure de l'activité de la LDH effectuée par le même opérateur est de 1 unité environ, et les mesures d'un laboratoire à l'autre donne une valeur de 5 unité.

- la sensibilité d'un dosage est définie par le plus petit écart mesurable. De plus, les résultats des dosages dépendent :

- de facteurs extrinsèques : température, pH, tampon, effecteurs...
- de facteurs intrinsèques : modifiant le taux d'enzyme.

Les résultats ne seront comparables que s'ils ont été effectués sur des sujets d'expérience de même sexe, du même âge (tableau 6) soumis au même régime : le taux de glucokinase et de pyruvate kinase hépatique s'abaisse fortement par exemple dans le jeûne glucidique.

Enzyme	Moyenne $\pm$ déviation standard		Activités foie humain.				
			Homme 28 ans	Femme 28 ans	Femme 40 ans	Enfant 4 mois	Homme 72 ans
GK	1,2	$\pm$ 0,4	0,3	0,8	0,5	1,8	1,2
PFK	0,45	$\pm$ 0,3	0,4	0,3	0,9	0,2	0,4
Aldo	2,3	$\pm$ 0,6	1,7	1,8	3,1	2,3	2,2
GAPD	64	$\pm$ 7,0	64	62	61	67	72
PGK	55	$\pm$ 8,0	43	66	52	49	59
Eno	21	$\pm$ 4,0	15	20	26	23	23
PK	18	$\pm$ 3,0	13	18	24	18	18
LDH	133	$\pm$ 50	73	133	38	101	210
PGM	22	$\pm$ 5,0	27	23	25		25
G-6-PD	1	$\pm$ 0,3	0,9	1,2	0,6	1,2	0,5

Tableau 6 - Cancer Research Strunk, 1964.

Chapitre 7

PATHOLOGIE

A - GENERALITES

Le développement récent de l'enzymologie clinique place le clinicien et le biologiste devant un nombre sans cesse croissant de dosages d'enzymes appliqués à la pathologie.

Les enzymes tissulaires ont été retrouvées dans les urines, beaucoup dans le sérum où ils ne jouent probablement aucun rôle biologique précis, à l'exception des systèmes protéolytiques actifs dans le phénomène de la fibrinolyse. Leur taux dépend des facteurs qui commandent leur passage à travers les barrières cellulaires, probablement aussi de leur métabolisme propre, c'est-à-dire de leur destruction ou de leur élimination par le rein. Si les modifications sériques de quelques enzymes de la glycolyse sont facilement décelées ; elles ne présentent pas toujours un grand intérêt.

La glycolyse est le reflet principal de l'activité cellulaire d'un organe ; si une affection quelconque modifie le métabolisme d'une cellule, la chaîne glycolytique sera perturbée. Et les enzymes ayant un caractère régulateur ou limitant par leurs faibles activités, seront les premiers modifiés. On ne peut les doser dans le sérum, leurs activités étant trop faibles. Les dosages ne porteront donc que sur les enzymes à forte activité, dont les modifications

sont plus tardives. Les renseignements fournis ne viendront que confirmer le diagnostic établi grace aux signes cliniques apparus entre temps : dans l'infarctus du myocarde les dosages révèlent une élévation prolongée du taux de L.D.H. sérique (130 à 141), cette donnée n'est pas suffisante car les troubles hépatiques, souvent associés, peuvent avoir le même effet. Donc se pose le problème de l'origine tissulaire de l'enzyme sérique.

1°) Arguments cinétiques

L'étude de la cinétique enzymatique permet souvent de rattacher un enzyme à un tissu. Ex: Origine de l'aldolase sérique dans les myopathies.

Comme les travaux de Sibley et Fleischer (103) montraient une aldolase sérique élevée aussi dans d'autres affections telles que: anémie hémolytique, hépatite aigue... la découverte de deux aldolases (105) nécessitant deux substrats différents: Fructose 1,6.diphosphate pour le type muscle et Fructose 1 Phosphate pour le type hépatique a permis de prouver que l'aldolase sérique au cours des myopathies était effectivement du type musculaire. Les constantes de Michaelis, les inhibiteurs chimiques et physiques les propriétés immunologiques, sont autant d'arguments qui permettent de découvrir l'origine d'un enzyme.

Nisselbaum (103) étudiant le pouvoir d'inhibition d'un sérum anti L.D.H. muscle de rat, sur des L.D.H. d'origine différente obtient les résultats suivants:

<u>Tissu d'origine</u>	<u>Taux d'inhibition</u>
-L.D.H. muscle de rat	80%
-L.D.H. foie de rat	70%
-L.D.H. rate de rat	43%
-L.D.H. rein de rat	25%
-L.D.H. coeur de rat	9%

2°) Arguments électrophorétiques

L'électrophorese sur gel d'amidon, agar, acétate de cellulose, la chromatographie sur colonne ont décelé cinq formes moléculaires de L.D.H. dont la répartition varie selon le tissu d'origine. La L.D.H. sérique augmentée de deux à cinq fois dans l'infarctus du myocarde (tableau I et II) est due à la nécrose du muscle cardiaque, comme le confirment les résultats de l'électrophorèse: pourcentage élevé de L.D.H.1 et L.D.H.2: (fractions les plus anodiques) isoenzymes caractéristiques du muscle cardiaque. De même l'électrophorese de L.D.H. urinaire peut dans certains cas renseigner sur l'origine tissulaire de l'enzyme.

3°) Arguments expérimentaux

La comparaison des taux de l'aldolase du sang artériel et du sang veineux, prélevés au niveau de la fémorale (IO4) a montré dans cinq cas de myopathie sur dix, une élévation plus nette dans la veine que dans l'artère. Il semble donc que, dans ces cas, la libération de l'aldolase du muscle vers le plasma ait été directement observée.

Enzymes sériques dans l'infarctus du myocarde (tableau I)

Enzymes	Références	Caractères
-S.G.O.T.	(48)	Elévation transitoire(2-4j)
-L.D.H.	(I30 à I4I)	Elévation plus prolongée.
-M.D.H.	(I3I-I49-I50)	Elévation transitoire.
-Aldolase	(I49)	Elévation non spécifique et durée variable.
-P.H.I.	(I5I)	Elévation non spécifique.
-Créatine kinase	(I52)	Elévation.
-2.OH.Butyrate deshydrogénase	(I52-I53)	Durée et élévation plus grandes que celle de la S.G.O.T. Plus spécifique que L.D.H.
-G.6.P.D.	(I43)	Non spécifique.Elévation plus marquée vers le 6ème jour.

Pourcentage des isoenzymes de la L.D.H. sérique.(Tableau II)

sérum normal	II.7	I6.7	26.8	28.8	I5.2
Infarctus du myocarde	49.8	29.I	II.4	7.4	I.9
	L.D.H.I	L.D.H.2	L.D.H.3	L.D.H.4	L.D.H.5

(WIEME.Réf:I40-I4I)

B) RESULTATS

1°) Glycolyse et maladies du foie

Les affections s'accompagnant d'une baisse des activités enzymatiques sériques traduisent une insuffisance cellulaire. Ainsi Van Reymenant (142) a signalé la baisse de la pyruvate kinase dans 60% des hépatites aiguës. Quand, au contraire, les activités enzymatiques sont augmentées, cela relève schématiquement de deux mécanismes :

-Reflux par stase biliaire. Il a été décrit (144) une augmentation de la G.6.P.D, mais n'étant pas constante, elle n'apporte que peu de renseignements au clinicien. (145-147).

-Syndrome de cytolyse. Plusieurs auteurs ont noté l'élévation des activités enzymatiques (146-154-155-156), notamment pour l'aldolase et la L.D.H. Des études tissulaires concomitantes ont mises en évidence un abaissement des activités des mêmes enzymes du parenchyme hépatique chez l'animal. Cependant il n'en serait pas toujours ainsi en pathologie humaine (157 à 161). En conclusion : les modifications sériques des enzymes de la glycolyse n'apportent que peu de renseignements, dans la majorité des cas, l'élévation n'est pas spécifique et les résultats ont souvent la même valeur pratique que ceux obtenus par des méthodes plus simples.

2°) Glycolyse et myopathies (100 à 130)

En 1949 Sibley et Lehninger ont observé une augmentation du taux de l'aldolase sérique chez deux sujets atteints de dystrophie musculaire (101). Depuis d'autres enzymes se sont révélés

Enzymes et maladies du FOIE (TABLEAU IV)

<u>Insuffisance cellulaire</u>	<u>Cholestase</u>	<u>Syndrome de cytolyse</u>
-P.K. ₂ (I42) 	-G.6.P.D.↑	-Aldo ↑ (I63 à I7I, I78) -G.6.Pase↑ (I79-I46) -L.D.H. ↑ (I72 à I82) -P.H.I. ↑ (I63) -P.H.M. ↑ -G.P.G.D.↑ -Transaminases↑ -Glutathion réductase↑

Variations du taux sérique de la Fructose I.6. aldolase
dans les maladies du foie (Tableau V)

	Moyennes	valeurs limites
-Taux physiologique	I00	56 à I48
-Hépatite aiguë	666	463 à 2000
-Hépatite chronique	82	I9 à I67
-Cirrhose	I4I	58 à 250
-Lithiase cholédocienne	II7	60 à 26I

La moyenne normale est arbitrairement fixée à I00.

(Bruns-and Neuhaus réf:I04)

augmentées: P.H.I.(109), Transaminases (110), L.D.H.(111), créatine kinase (112). Parallèlement des études ont été menées sur le tissu musculaire afin d'expliquer et de confirmer ces résultats (106-107-108): dans la forme précoce de la maladie, le tableau enzymologique montre une baisse marquée des enzymes de la glycogénolyse contrastant avec le maintien des enzymes du cycle de Krebs et une augmentation de certains enzymes du catabolisme, notamment protéique(113-114). (Tableau III).

Ce tableau, non spécifique puisque retrouvé identique dans les atrophies neurogènes, n'apporte une aide importante ni au diagnostic, ni pour une explication pathogénique. La découverte, en 1962 par Wiemo (116) et Schapira, d'une ressemblance entre la L.D.H. du muscle myopathe et celle du muscle foétal a pour quelque temps ouvert de nouveaux horizons. Cependant là encore le phénomène n'est pas spécifique puisqu'il a été retrouvé au cours de l'atrophie neurogène.

3°) Glycolyse et maladies rénales (181 à 200)

L'étude des activités enzymatiques du sérum et des urines au cours des néphropathies en est à ses débuts.

-Activités sériques. Zimmerman dosant l'activité de la L.D.H. sérique chez 71 sujets atteints de maladies rénales diverses note une augmentation dans 50% des cas. Amelung (182) chez des malades avec nécrose tubulaire aigue, note une élévation légère, par contre une activité haute, en cas d'anurie complète. Mais ces variations ne sont pas constantes. Une élévation de l'aldolase au cours de certains syndromes néphrotiques a été décrite par Van Strijthem.(183).

Modifications enzymatiques au cours des myopathies (Tableau III)

<u>Enzymes Musculaires</u>		<u>Enzymes sériques</u>	
-Phosphorylase:	30%	-I.H.I.:	240%
-Aldolase:	30%	-L.D.H.	380%
-P.H.M.	30%	-Créatine kinase	5000%
-A.T.P.ase	↑	-G.P.T.	520%
-L.D.H.	↑	-G.O.T.	330%

Les résultats sont rapportées à la valeur normale fixée arbitrairement à 100.

-Activites urinaires. Dans les urines de sujets sains, la L.D.H. est généralement retrouvée, malgré la présence de deux inhibiteurs spécifiques. (184). Des recherches ont été effectuées pour définir l'origine de ces enzymes.

L'expérimentation sur l'animal tend à prouver que les enzymes de la glycolyse ne sont pas éliminés par le rein. Injectant de la L.D.H. par voie intraveineuse chez le lapin, Amelung ne l'a pas retrouvée dans les urines. Après avoir clampé les artères rénales il note une nette augmentation de la L.D.H. dans les urines. Une néphrectomie bilatérale, ou une ligature des uretères chez

le rat, provoquent une augmentation de l'activité aldolasique urinaire. Donc les enzymes retrouvées proviendraient des tissus urinaires. Pour Klauss (185) le glomérule pourrait devenir perméable au cours des néphropathies. Cependant les électrophoreses pratiquées sur des urines débarassées de leucocytes et de globules rouges, montrent quelquefois une L.D.H. assez comparable à celle du rein.

Les données apportées, par les enzymes urinaires, ne sont donc pas interprétables, puisque l'on ne connaît pas avec certitude le tissu d'origine.

Cette étude des enzymes glycolytiques nous oblige à conclure que beaucoup de variations sont ininterprétables parce qu'inconstantes et non spécifiques. De plus l'origine de ces enzymes est souvent imprécise.

Lorsque les enzymes glycolytiques de chaque tissu, sain et pathologique, seront mieux connus, les résultats des dosages des liquides biologiques pourront être interprétés. Si ces études peuvent être facilement entreprises pour un tissu tel le foie, ou une population cellulaire telle: le globule rouge (175 à 180), il n'en n'est pas de même pour les tissus à structures cellulaires variées: le rein par exemple. Alors des méthodes micro et histochimiques permettront seules de définir l'origine cellulaire de l'enzyme.

CONCLUSION

L'extrême fragilité des enzymes rendant difficile la détermination de leurs activités, le prélèvement tissulaire, l'homogénéisation et les dosages doivent être minutieux et les techniques standardisées: un changement dans la durée de centrifugation, par exemple, peut expliquer des résultats différents.

Ces résultats doivent être rapportés à un paramètre tissulaire convenablement choisi, (poids frais, poids sec, protéines, azote ou A.D.N.) et même à plusieurs paramètres ceux-ci n'évoluant pas toujours de façon parallèle.

Les résultats divergents des laboratoires peuvent s'expliquer, aussi, par des techniques différentes de dosage et même par l'emploi de substrats plus ou moins purs. De plus le taux d'enzyme pouvant varier avec l'âge, le sexe ou le régime alimentaire, l'interprétation doit être prudente.

En pathologie, les résultats, des dosages des enzymes de la glycolyse dans le sérum ou les urines, ont bien souvent la même valeur pratique que ceux obtenus par des méthodes plus simples. De plus les activités étant à peine décelables pour la plupart des enzymes, les dosages tissulaires semblent

s'imposer. Un tissu étant formé, le plus souvent, de structures cellulaires différentes, les résultats sont difficiles à interpréter.

Seules des méthodes micro et histochimiques permettront de séparer ces structures et d'étudier leur comportement devant une affection quelconque.

Les variations dans les liquides biologiques pourront alors mieux être interprétées et éventuellement orienter le clinicien vers une biopsie tissulaire à la recherche de données supplémentaires biochimiques ou anatomopathologiques.

Vu, le Président de Thèse

Professeur CARTIER

Vu, le doyen de la Faculté:

Professeur G. BROUET

Vu et permis d'imprimer:

Le Recteur de l'Académie de Paris

J. ROCHE

BIBLIOGRAPHIE

- 1 --MICHAELIS L., MENTEN M.L. Biochem. J., 1913, 49, 333
- 2 --VAN SLYKE D.D. , CULLEN G.E.J., Biol.Chem., 1914, 19, 41
- 3 - BRIGGS G.E. , HALDANE J.B.S., Biochem. J.,1925, 19, 338
- 4 - HALDANE J.B.S., "Enzymes", Longurans, Green and Co, 1930
- 5 - WILSON P.P.N., "Respiratory Enzymes", Burges Publ. Co.
Minnéapolis, Minn. 1949
- 6 - ALBERTY R.A. Advances in Enzymology, 1956, 17, 1
- 7 - DIXON M., Biochem.J., 1953, 55, 161
- 8 - MEISTER A., J. Biol. Chem.,1950, 184, 117
- 9 - SIZER W., Advances in Enzymology, 1943, 3, 35
- 10 - MOELWYN-HUGHES,E.A., " The Enzymes ",Summers J.B. and
Myrbach Editors. Acad. Press N.Y., 1951
- 11 - GLASSTONE S., LAIDLER K.J., EYRING H., "Theory of rate
processes ",Mc. Graw Hill Book Co N.Y. 1941
- 12 - VESSEL E., Nature, 1966, 210, 420
- 13 - HALDANE J.B.S., " Enzymes ",Longurans, Green and Co,
London, 1930
- 14 - PLAGEMANN P.G.N., GREGORY K.F., WROBLESKY F., J. Biol.
Chem., 1960, 235, 2288
- 15 - NEILANOS J.B., Science, 1952, 115, 143
- 16 - WU R., J. Biol. Chem., 1965, 240, 2373
- 17 - NEWSHOLME E.A., RANDLE P.J., Biochem. J., 1964, 93, 641
- 18 - LEPINE R., Le diabète sucré. Baillière. Paris 1909
- 19 - WARBURG O., Biochem. Z., 1923, 142, 317

- 20 - WARBURG O., Ueber den Stoffwechsel der Tumoren.
Springer. Berlin. 1926
- 21 - WARBURG O., Naturwiss., 1955, 42, 401
- 22 - WARBURG O., CHRISTIAN W., GRIESE A?, Biochem. Z.
1935, 282, 157
- 23 - HORECKER B.L.J., Cell. Comp. Physiol., 1953, 41 Suppl.
137
- 24 - COHEN S.S., J. Biol. Chem., 1951, 66, 509
- 25 - DICKENS F., GLOCK G., Biochem. J., 1951, 50, 81
- 26 - DE DUVE C., BERTHET J., J. Theoret. Biol., 1964, 6, 225
- 27 - CRANE and SOLS, J. Biol. Chem., 1953, 203, 273
- 28 - HORECKER B.L., SMYRNIOTIS P., J. Amer. Chem. Soc.,
1953, 75, 1009
- 29 - SWANSON M.A., J. Biol. Chem., 1950, 184, 647
- 30 - HERS H.G., TUSAKA T., Biochem. et Biophys. Acta, 1953, 11, 427
- 31 - STUMPF P.K., Chemical pathways of metabolism, Chap. 3, Vol. 1
Acad. Press, N.Y. 1954
- 32 - MARCKS P.A., FEIGELSON, J. Biol. Chem., 1957, 226, 1001
- 33 - WARBURG O., CHRISTIAN W., Biochem. Z., 1931, 242, 206
- 34 - BECK W., J. Biol. Chem., 1958, 232, 251
- 35 - NEIFAKH S., MELNIKOVA M., Biokhimiya, 1958, 25, 440
- 36 - RAPOPORT S., LUEBERING J., J. Biol. Chem., 1950, 183, 507
- 37 - RAPOPORT S., LUEBERING J., J. Biol. Chem., 1951, 189, 683
- 38 - RAPOPORT S., LUEBERING J., 1952, 196, 583
- 39 - RAPOPORT S., NIERADT C., Biochem. Z., 1955, 326, 231
- 40 - HASHIMOTO T., YOSHIKAWA, Biochim. Biophys. Acta, 1962, 65, 355

- 41 - HIATT H.H., LARREAU, J. Biol. Chem., 1960, 235, 1241
- 42 - KINOSHITA J., J. Biol. Chem., 1957, 228, 247
- 43 - LORCK G.E., MAC LEAN P., Biochem. Biophys. Acta , 1953,
12, 590
- 44 - LORCK G.E., MAC LEAN P., Biochem. J., 1954, 56, 171
- 45 - MAC LEAN P., Biochem. Biophys. Acta, 1958, 30, 303
- 46 - MAC LEAN P., Biochem. Biophys. Acta, 1958, 30, 316
- 47 - POTTER R., NIEMEYER H., Ciba Foundation. Symposium on the
regulation of cell metabolism. Churchill ed.
London 1959, 230, 253
- 48 - LEPAGE, J. Biol. Chem., 1948, 176, 1009
- 49 - ENGELHARDT W.A., Biochem. Z., 1932, 251, 343
- 50 --KALKHAR H., Enzymology, 1937, 2, 47
- 51 - WU R., RACKER E., J. Biol. Chem., 1959, 234, 1038
- 52 - KORFF R., TWEDT R., Biochem. Biophys. Acta, 1957, 23, 143
- 53 - WU R., RACKER E., J. Biol. Chem., 1959, 234, 1036
- 54 - GATT S., RACKER E., J. Biol. Chem., 1959, 234, 1015
- 55 - GATT S., RACKER E., J. Biol. Chem., 1959, 234, 1023
- 56 - LEPAGE G.A., SCHNEIDER W.C., J. Biol. Chem., 1948., 176, 1021
- 57 - SCHNEIDER W.C., POTTER V.R., J. Biol. Chem., 1949, 177, 393
- 58 - SCHNEIDER W.C., J. Biol. Chem., 1948, 176, 259
- 59 - BERGMAYER H.U., Methods of enzymic analysis. Acad. Press
New York 1963
- 60 --SHONK C.E., BOXER G.E., Cancer Research, 1964, 24, 709
- 61 - SHONK C.E., KOVEN B.J., MAJIMA H., BOXER G.E., Cancer
Research, 1964, 24, 722

- 52 - SCHMIDT and SCHMIDT, Klin. Worsch., 1960, 38, 957
- 53 - ANTOINE B., CLAUDE J., R. Pathol. biol., 1964, 12, 3-4, 198
- 54 - SAINT AUDAIN, BUCHER, Anat. Rec., 1952, 112, 797
- 55 - HARRISON, Nature, 1953, 171, 611
- 56 - BIRDECK, STEWART, Canad. J. Biochem. and Physiol., 1961,
39, 257
- 57 - HOHORST H., Biochem. Z., 1957, 323, 509
- 58 - SHONK C.E., Proc. amer. association for cancer research
1965, 230
- 59 - ZONDAG H.A., Science, 1963, 142, 965
- 70 - FRITZ P.J., JACOBSON K.B., Science, 1963, 140, 64
- 71 - HOGSDOOM, J. Biol. Chem., 1948, 172, 619
- 72 - SLEIN M.W., CORI G.T., CORI C.F., J. Biol. Chem., 1950,
186, 763
- 73 - SOLS A., Regulation of liver glucokinase and muscle hexokinase
- 74 - WALKER D.G., Biochem. Biophys. Acta, 1963, 77, 209
- 75 - VENUELA E., SALAS M., SOLS A., J. Biol. Chem., 1963, 238,
PC 1175
- 76 - DI PIETRO D.L., SHARMA C., WIENHOUSE S., Biochemistry 1962
1, 455
- 77 - CRANE R.K., SOLS A., J. Biol. Chem., 1954, 217, 595
- 78 - FROMM H.J., KEWE V.J., J. Biol. Chem., 1962, 237, 1661
- 79 - WARBURG O., CHRISTIAN, Biochem. Z., 1941, 310
- 80 - WARBURG O., Wassers toffubertragendie fermente, Verlag
Dr. W.Saenger, Berlin, 1948
- 81 - LILIENTHAL J.L., ZIERLER K.L., FOLK B.P., J. Biol. Chem.,
1950, 182, 501

- 82 - ABERCROMBIE M., JOHNSON M.L., J? Neurol. Neurosurg. Psychiat.
1946, 2, 113
- 83 - CORI G.T., SLEIN M.W., CORI C.F., J. Biol. Chem., 1948,
173, 605
- 84 - ZEISENBERG G., BOLTZE H.J., BUCHER T., CZOK R., GARBADE K.M.
PFLEIDERER G.. Naturforsch., 1953, 8b,
555
- 85 - BUCHER T., PFLEIDERER G., Methods in Enzymology, Colowick et
Kaplan, Acad. Press N.Y., 1955, 1, 435
- 86 - RACKER E., J. Biol. Chem., 1947, 167, 843
- 87 - CHAPMAN R.G., HENNESSEY M.A., WALTERSDORF A.M., HUENNEKENS F.,
GABRIO B.W., J. Clin. Invest., 1962,
41, 1249
- 88 - BUCHER T., Methods in Enzymology, Colowick et Kaplan, Acad.
Press N.Y., 1955, 1, 415
- 89 - SHARMA C., MANJESHWAR R., WIENHOUSE S., J. Biol. Chem., 1963
238, 3840
- 90 - KORNBERG A., HORECKER B.L., Methods in Enzymology, Colowick
et Kaplan, Acad. Press N.Y., 1955, 1, 323
- 91 - HORECKER B.L., SMYRNIOTIS P., J. Biol. Chem., 1951, 193, 371
- 92 - KLENOW H., EMBERLAND R., Arch. Biochem. Biophys., 1955, 58, 276
- 93 - SREERE P., COOPER J.R., TABACHNIK M.? RACKER E., Arch. Biochem.
1958, 74, 295
- 94 - KUBOWITZ F., OTT P., Biochem. Z., 1943, 314, 94
- 95 - --WU R., RACKER E., J. Biol. Chem., 1959, 234, 1029
- 96 - DELBRUCK A., ZEBE E., BUCHER T., , Biochem. Z, 1959, 331, 273

- 97 - DUBACH U.C., *Helvétia. Med. Acta.* I966. 33.
- 98 - SLEIN M.W., *J. Biol. Chem.* I950. I86. 753.
- 99 - ANDERSON. *Physical techniques in Biological research.* I956.
3. 299. Acad. Press. New-York.
- IOO - BRENDLER. *Science.* I95I. II4. 6I.
- IOI - PIERCE., *J. Exper. Médic.* I953. 97. I89.
- IOIb - WARBURG O., CHRISTIAN W. *Garuumfermenté im blutsérum von tumor-ratten.* *Biochem. Z.* I943. 3I4. 399.
- IO2 - SIBLEY J.A., LEHNINGER A.L., *J. Natl. Cancer inst.* 9. 303. I949.
- IO2b - HOHORST H., *Biochem. Z.* I957. 328. 509.
- IO3 - SIBLEY J.A., FLEISCHER G.A., *The clinical signifiance of serum aldolase.* *Proc. Staff. meeting.*
- IO3b - NISSELBAUM J.S., BODANSKY O., *J. Biol. Chem.* I96I. 236. 40I.
- IO4 - BRUNS., NEUHANS., *Arch. Biochem.* 55. 588. I955.
- IO4b - DREYFUS J.C., SCHAPIRA G., DEMOS J., *Clin. Chim. Acta.* 3. 57I. I958.
- IO5 - SCHAPIRA F., DREYFUS J.C., SCHAPIRA G., *Compt. Rend. Acad. Sci.* 245.
245. 808. I957.
- IO6 - RONZONIE E., BERG L., LANDAU W., *Res. Publ. RES. Nervous mental disease.* 38. 72I. I96I.
- RONZONIE E., WALD S., BERG L., RAMSEY R., *Neurology.* 8. 359. I958.
- IO7 - ARONSON S.M., VOLK B.W., *Arch. Neurol. Psychiat.* 75. 568. I956.
- IO8 - VIGNOS P.J., LEFKOWITZ M.A., *J. Clin. Invest.* 38. 873. I959.
- IO9 - SCHAPIRA G., DREYFUS J.C., SCHAPIRA F., KRUH J., *Am. J. Phys. Med.* 34. 3I3. I955.
- II0 - DREYFUS J.C., SCHAPIRA G., *Compt. Rend. Soc. Biol.* I49. I934. I955.
- III - SCHAPIRA G., DREYFUS J.C., *Compt. Rend. Soc. Biol.* I5I. 22. I957.

VII

- II2 -EBASHI S., TOYOKURA Y., MOMOI H., SURGITA H., J. Biochem.
46. 103. 1959.
- II3 -COLEMAN D.L., ASWORTH M.E., Ann. J. Physiol. 197. 839. 1959.
- II4 -KRUH J., DREYFUS J.C., GEY G.O., J. Clin. Invest. 39. 1180. 1960.
- II5 -DREYFUS J.C., SCHAPIRA G., SCHAPIRA F., J. Clin. Invest.
33. 794. 1954.
- II6 -WIEME R.J., HERPOL J.E., Nature. 194. 287. 1962.
- II7 -PAUNIER L., ROTTHAUVE H.W., Enzymol. Biol. Clin. 3. 87. 1963.
- II8 -MORRELL R.M., A.M.A. Arch. Intern. Med. 104. 99. 1959.
- II9 -EVANS J.H., BAKER R.W.R., Brain. 80. 557. 1957.
- I20 -KUHN E., WÖRNER W., Z. Klin. Med. 155. 544. 1959.
- I21 -SALVI G., AMBANELLE U., ROSATI G., CARRERAS M., MIRONI F.,
Riv. Pathol. Nervosa. Mentale. 80. 1. 1959.
- I22 -PEARSON C.M., Arthritis. Rheumat. 2. 127. 1959.
- I23 -MELORAN A.Y., Proc. Assoc. Res. Nervous. Mental. Disease.
32. 400. 1953.
- I24 -DREYFUS J.C., SCHAPIRA G., DEMOS J., ALEXANDRE Y., Rev. Franc. Etude
Etudes. Clin. Biol. 5. 384. 1960.
- I25 -DUBOWITZ V., Brain. 83. 432. 1960.
- I26 -DUBOWITZ V., Proc. Roy. Soc. Med. 56. 810. 1963.
- I27 -PEARSON C.M., New. Engl. J. Med. 256. 1069. 1957.
- I28 -SIEKERT R.G., FLEISCHER G.A., Proc. Staff. Meetings. Mayo. Clin.
31. 459. 1956.
- I29 -DAVIDSON E.A., RILEY J.C., J. Biol. Chem. 235. 3367. 1960.
- I30 -DULCE H.J., Z. Physiol. Chem. 319. 257. 1960.
- I31 -WROBLEWSKI F., LADUE J.S., Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 90. 310. 1955.
- I32 -WROBLEWSKI F., RUEGSEGGER P., LADUE J.S., Science. 123. 1122. 1956.

- I33 -AMELUNG D., HORN H.D., Dtsch. Med. Wschr. 81, 1701. 1956.
- I34 -HSIEH K.M., BLUMENTHAL H.T., Proc Soc. Exper. Biol. Med. 91. 626. 1956
- I35 -ZIMMERMANN H.J., WEINSTEIN H.G., J. Laborat. Clin. Med. 48.
607. 1956.
- I36 -GAVOSTO F., BRUSCA A., DISTASI M., PILERI A., VERGNANO F.
Minerva. Med. 47. II. 1078. 1956.
- I37 -WACKER W.E.C., ADELSTEIN S.J., ULMER D.D., VALLEE B.L.,
J. Clin. Invest. 35. 741. 1956.
- I38 -HANSON A., BIORCK G. Acta. Med. Scand. 157. 493. 1957.
- I39 -SCHLIEF H., KAMM P., Klin. Wschr. 35. 1083. 1957.
- I40 -WIEME R.J., Studies on agar electrophoreses, techniques,
applications. Thesis. Arscia. Brussels. 1959.
- I41 -WIEME R.J., Van MAERCKE Y., Ann. N.Y. Acad. Sci. 94. 398. 1961.
- I42 -Van REYMEYNT M., TAGNON H.J., New. Engl. J. Med. 261. 1325. 1959.
et 1373. 261. 1959.
- I43 -KERFOLLA W., NIKILLA E.A., PITKANEN E. Acta. Med. Scand. 166.
17. 1959.
- I45 -BOEHRINGER C.F., SOEHNE. Mannheim Germany industrial
communication. 1961.
- I46 -BRUNS F., PULS W., Klin. Wschr. 32. 656. 1954.
- I47 -LAUDAHN G. Moderne enzymdiagnostik in der klinik
therapy des monats. Mannheim. 10. 190. 1960.
- I48 -LADUE J.S., WROBLEWSKI F., KARMEN A., Science. 120. 497. 1954.
- I49 -SIEGEL A., BING R.G., Proc. Soc. EXP. Biol. New-YORK. 91. 604. 1956.
- I50 -ORDELL R. Paper presented at 2nd European congress of
cardiology Stockholm. 1956.

- I51 -WHITE L.P., New.Engl.J.Med.255.984.I956.
- I52 -ROSALKI S.B., WILKINSON J.H., Nature I88.III0.I960.
- I53 -ELLIOT B.A., WILKINSON J.H., Lancet.698.I96I.
- I54 -KOIDE H., ODA T., Clin.Chim.Acta.I959.4.554.
- I55 -NICOLA P., PETRONIO L., SATORI S., Fegato.I958.4.280.
- I56 -RITIS F., COLTORTI M., GIUSTI., Minerva.47.I.I956.
- I57 -SOBOLEVA V.D., Sovet.Med.2.I30.I960.
- I58 -ZELMAN S., WANG C.C., APPERHANZ I., Amer.J.Med.SCI.237.
323.I959.
- I59 -DONATO R.A., Amer.J.Med.Sci.Path.I54.593.I957.
- I60 -GOLDSTEIN F., SELIGSON D., BOCKUS H.L.Gastroenterology.
36.487.I959.
- I61 -RESS K.R., SINHA K.P., J.Path.Bact.80.297.I960.
- I62 -DEBRE R., DREYFUS J.C., SCHAPIRA F., SCHAPIRA F.,
Rev.Franc.Etud.Clin.Biol.3.269.I958.
- I63 -BRUNS F., PULS W., JACOB W., Klin.Wschr.32.IO4I.I954.
- I64 -KATZ R., DUCCI H., Amer.J.Dig.Dis.3.5I7.I958.
- I65 -POJER J., JEZEK P., NINGER E., TOVAREK., J., Gastroenterologia
96.26.I96I.
- I66 -SERGEEV N.U., SINAIKO., Sovet.Med.9.46.I959.
- I67 -SIBLEY J.A., Ann.N.Y.Acad.Sci.75.339.I958.
- I68 -WOLF H.F., FORSTER G., LEUTHARDT F., Gastroenterologia
87.I72.I959.
- I69 -BRECHT W., KUENKELE I., Klin.Wschr.33.936.I960.
- I70 -FORSTER G., JENNY E., Helv.Med.Acta.26.673.I959.
- I71 -SCHAPIRA F., Thése.Paris.I959.

- I72 -HORN H.D., AMELUNG D., Dtsch. Med. Wschr. 82. 619. 1957.
- I73 -HSIEH K.M., BLUMENTHAL H.T., Proc. Exper. Biol. Med. 91. 626. 1956.
- I74 -SCHNEIDERBAUER A., RETTENBACHER F., Wien. Med. Wschr. 109.
744. 1959.
- I75 -TROBLEWSKI F., LADUE J.S., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90. 210. 1955.
- I76 -CARSON P.E., SCHRIERS L., ALUING A.S., J. Laborat. Clin. Med.
43. 794. 1959.
- I77 -ELLIOT B.A., WILKINSON J.H., Clin. Sci. 24. 343. 1963.
- I78 -PAGLIARD L., MANNINO V., Bull. Soc. Ital. Biol. 39. 141. 1963.
- I79 -WEST M., ZIMMERMAN H.J., Arch. Intern. Med. 102. 1958.
- I80 -SCHALMOVITZ M., BODANSKI O., J. Biol. Chem. 234. 1433. 1959.
- I81 -WU C.P., SUNG J.L., Gastroenterology. 42. 580. 1962.
- I82 -AMELUNG D., HORN H., SCHRODER E., Klin. Wschr. 1958. 36. 963.
- I83 -RUDOLPH L., SCHAEFER J.A., DUTTON R.E., LYONS R.H., J. Lab.
Clin. Med. 1957. 49. 31.
- I84 -KLAUS D., Klin. Wschr. 1958. 36. 207.
- I85 -DUBACH U.C., REDIGER R., Urol. Int. 1964. 17. 65.
- I86 -DUBACH U.C., PADLINA G., Klin. Wschr. 1966. 44.
- I87 -DUBACH U.C., Helv. Med. ACTA., 1966. 33.
- I88 -WEST M., ZIMMERMAN M.J., J. Lab. Clin. Med., 1958. 52. 185.
- I89 -CROCKSON R.A., Lancet., 1961. I. 140.
- I90 -HIARATA G., Biochem. Z. 1910. 28. 23.
- I91 -ROSALKI S.B., WILKISON J.H., Lancet., 1959. 7098. 327.
- I92 -FOJER J., MOJZIS A., TOVAREK J., Rev. Fran. Et. Clin. Biol.,
1960. 5. 919.

- I93 --BARTELS H., SCHWEIZ .Med.Wschr.I966 .96 .39 .I304.
 - I94 --Mc .CANN .WF ., Amer.J.Physiol .I956 .I85 .372 .
 - I95 --POLLAK .V.E ., BONTING S.L ., MUEHRCKE R.C ., J.Lab.Clin.Med .
I958 .52 .934 .
 - I96 --BONTINGS S.L ., POLLAK V.E ., MUEHRCKE R.C ., KARK R.M, J.Clin .
Invest .I960 .39 .I372 .
 - I97 --WACHSTEIN M ., MEISEL E ., J.HISTOCHEM.Cytochem.I957 .5 .204 .
 - I98 --POLLAK .V.E ., BONTINGS S.L ., MUEHRCKE R.C ., J.Clin.Invest .
I960 .39 .I394 .
 - I99 --ULRICH C ., DUBACH U.C ., RECAN T L ., J.Clin.Invest .I960 .
39 .I364 .
 - 200 --DUBACH U.C ., RECAN T L ., Klin.Wschr.I962 .40 .333 .
-

